



Universidade Federal de São Carlos
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Curso de Engenharia Agrônoma



MARIANA PELAIS LEITE

**DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NO CULTIVO IN VITRO DE TRÊS
GENÓTIPOS DE ROSEIRAS**

ARARAS - 2022



Universidade Federal de São Carlos
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Curso de Engenharia Agrônoma



MARIANA PELAIS LEITE

**DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NO CULTIVO IN VITRO DE TRÊS
GENÓTIPOS DE ROSEIRAS**

Monografia apresentada ao Curso de
Engenharia Agrônoma – CCA – UFSCar para
a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso

ARARAS – 2022

Dedico este trabalho ao meu pai, à minha mãe, e à minha irmã, por todo apoio, incentivo e alegria que sempre me proporcionaram em cada etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que em sua infinita bondade sempre cercou minha vida com muitas graças: a saúde de quem eu amo, a educação e o amor que recebi em minha casa, minha família e muitas outras bênçãos diárias. A Nossa Senhora que sempre me amparou em todos os meus caminhos.

Ao meu pai, Adalto Aparecido Leite por sempre ser meu exemplo do que é certo, pela paciência e por todo cuidado que sempre teve comigo. À minha mãe, Susana Pelais Leite, que sempre me deu forças e é meu exemplo de amor e fé, porque sem você eu não conseguiria ter dado um passo sequer em minha vida.

À minha irmã, Amanda Pelais Leite, sem a qual, definitivamente, eu seria muito infeliz, obrigada por crescer comigo e por estar comigo sempre.

Aos meus avós, pois suas escolhas me possibilitaram essa vida e eu agradeço-os, em especial à minha avó Maria Aparecida dos Santos Mano que sempre foi terna comigo.

À minha priminha Laura Pelais Regente, que trouxe tanta alegria à família toda, te ver crescer é um presente.

À minha grande amiga, Cristina Hildebrand, a graduação não seria possível sem sua orientação e apoio.

Agradeço aos amigos que fiz na faculdade, Gustavo Devitte, Leticia Abatti, Daniella Soares e Nizza Rodrigues, vocês tornaram as reuniões de estudo, as vésperas de provas e a graduação, mais leves e alegres.

Aos integrantes e a equipe do Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos, pelos conhecimentos compartilhados e pela ajuda no decorrer desses três anos, agradeço aqui em especial à Carla Midori Iiyama e Joe Abdul Vilcherrez Atoche pela amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso, pelas oportunidades, paciência e confiança, é uma honra ter sido aluna do senhor, e ingressar no laboratório, certamente, foi uma das minhas melhores decisões na graduação.

Aos integrantes da minha banca examinadora, Me. Willian Naves Duarte e Prof. Dr. Eduardo Dal'Ava Mariano, pela disponibilidade, ponderações e correções que contribuíram para melhoria deste trabalho.

Aos meus professores e professoras da graduação, por toda contribuição em minha formação, seja através de ensinamentos profissionais, de postura ou de vida, que Deus os abençoe.

À Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, que me proporcionou tanto crescimento, é um misto de orgulho, honra e alegria poder lá ter estudado e me sinto incrivelmente sortuda por isso.

***“Recria tua vida, sempre, sempre.
Remove pedras e planta roseiras e faz doces. Recomeça.”***

Cora Coralina

RESUMO

A Rosa é considerada uma das espécies de flores de corte mais importantes do mundo, sendo que os principais sistemas de propagação tem sido a estaquia e a enxertia. No entanto, a micropropagação de rosas vem sendo aplicada para a produção de genótipos isentos de pragas e doenças, bem como no melhoramento genético com uso da biotecnologia. Entre os maiores desafios do uso mais amplo da micropropagação são os altos custos e o baixo rendimento de mudas, e a presença de anomalias fisiológicas como aborto precoce de folhas e dificuldades com o enraizamento in vitro. Dessa forma, esse trabalho teve por objetivo desenvolver um estudo sobre os efeitos do meio de cultura, especialmente a formulação salina de cada um, sobre o processo de enraizamento de três genótipos de roseiras in vitro. O meio de cultura apresentou resultado significativo para sete dos onze parâmetros biométricos avaliados, número de raízes, comprimento da maior raiz, massa fresca, massa fresca de parte aérea, massa fresca de raiz, massa seca, massa seca de parte aérea. A interação entre genótipo e meio foi significativa para número de folhas, massa seca da raiz, número de raízes e comprimento da maior raiz. Já o efeito isolado do genótipo foi significativo para número de folhas, comprimento da maior raiz, número de raízes, massa fresca, massa fresca de parte aérea, massa fresca da raiz, e massa seca total. Em geral os resultados se apresentaram bem heterogêneos, sendo possível observar que de acordo com o parâmetro determinado meio se mostrava mais adequado – Meios mais restritivos como WPM e A4 promoveram melhores resultados para número de raízes e comprimento da maior raiz enquanto que os meios MS e B5 estiveram ligados a resultados significativos para massa fresca total e de parte aérea e ainda que dentro de determinado genótipo não houve diferença entre os meios para a maioria dos parâmetros, como ocorreu com o genótipo mesclada em comparação com os genótipos alaranjada e azulada.

Palavras-chave: Micropropagação; cultura de tecidos vegetais; nutrição vegetal; Enraizamento; formulação salina.

ABSTRACT

Rose is considered one of the most important cut flower species in the world, and the main propagation systems have been cuttings and grafting. However, the micropropagation of roses has been applied for the production of genotypes free from pests and diseases, as well as in the genetic improvement with the use of biotechnology. Among the biggest challenges of the wider use of micropropagation are the high costs and low yield of seedlings, and the presence of physiological anomalies such as early leaf abortion and difficulties with in vitro rooting. Thus, this work aimed to develop a study on the effects of the culture medium, especially the saline formulation, on the rooting process of three genotypes of rose bushes in vitro. The culture medium showed a significant result for seven of the eleven biometric parameters evaluated, number of roots, length of the largest root, fresh mass, fresh mass of shoot, fresh mass of root, dry mass, dry mass of shoot. The interaction between genotype and medium was significant for number of leaves, dry mass of the root, number of roots and length of the largest root. The isolated effect of the genotype was significant for number of leaves, length of the largest root, number of roots, fresh mass, fresh mass of shoot, fresh mass of the root, and total dry mass. In general, the results were very heterogeneous, and it was possible to observe that, according to the parameter, a given medium was more suitable - More restrictive media such as WPM and A4 promoted better results for number of roots and length of the largest root while MS and B5 were linked to significant results for total and aerial fresh mass - and even within a certain genotype there was no difference between the media for most parameters, as occurred with the mixed genotype compared to the orange and bluegenotypes.

Palavras-chave: Micropropagation; tissue culture; plant nutrition. rooting; Vegetable regulators.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Gráfico do Número de folhas de cada genótipo em seis meios de cultura testados: Gamborg B5(B5), Wood Plant Medium (WPM), Quoirin & Lepoivre (QL), Murashige e Skoog modificado (MS-Rosa) e Murashige e Skoog (MS).
..... 44
- Figura 2 - Massa fresca de parte aérea dos genótipos nos meios de cultura Gamborg B5 (B5), Wood Plant Medium (WPM), Quoirin & Lepoivre (QL), Murashige e Skoog modificado (MS-Rosa) e Murashige e Skoog (MS)..... 46
- Figura 3 - Número de raízes dos genótipos em cada meio de cultura: Gamborg B5 (B5), Wood Plant Medium (WPM), Quoirin & Lepoivre (QL), Murashige e Skoog modificado (MS-Rosa) e Murashige e Skoog (MS). 49
- Figura 4. Figura 5 – Comprimento da Maior Raiz para cada genótipo nos meios Gamborg B5 (B5), Wood Plant Medium (WPM), Quoirin & Lepoivre (QL), Murashige e Skoog modificado (MS-Rosa) e Murashige e Skoog (MS)..... 52
- Figura 6 - Massa fresca total de três genótipos nos meios Gamborg B5 (B5), Wood Plant Medium (WPM), Quoirin & Lepoivre (QL), Murashige e Skoog modificado (MS-Rosa) e Murashige e Skoog (MS)..... 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição básica e mantida idênticas para micronutrientes nos seis meios de cultura (B5, WPM, MS, QL, A4 e MSR) utilizados para o cultivo in vitro de roseiras.....	37
Tabela 2. Quantidades fornecidas de macronutrientes em cada formulação salina de meio de cultura.....	38
Tabela 3. Itens, instrumentos, e tempos de avaliação das plântulas.	40
Tabela 4. Teste Comparativo de Tukey para número de folhas, comprimento da maior brotação, massa fresca de parte aérea, e massa seca de parte aérea em cada genótipo.....	42
Tabela 5. Análise de Variância para interação meio X genótipo em número de folhas.	43
Tabela 6. Efeito simples dos meios dentro de genótipo Laranja.....	43
Tabela 7. Teste de Tukey para comprimento da maior brotação.	44
Tabela 8. Efeito dos meios sobre massa fresca de parte aérea.....	46
Tabela 9. Efeito dos meios sobre massa seca de parte aérea.....	47
Tabela 10. Efeitos do genótipo, meio e interação sobre raízes das plântulas.....	47
Tabela 11. Efeito dos meios no desenvolvimento in vitro de raízes de roseiras.	48
Tabela 12. ANOVA para Efeitos Simples dos meios para o parâmetro biométrico número de raízes.	50
Tabela 13. Efeito simples dos meios no genótipo Azul para o parâmetro biométrico número de raízes.	51
Tabela 14. Efeito simples de meio no genótipo Laranja para o parâmetro biométrico número de raízes.	51
Tabela 15. Efeito dos meios sobre comprimento da maior raiz.	52
Tabela 16. Efeito simples dos meios sobre comprimento da maior raiz dentro do genótipo azul.....	53
Tabela 17. Efeito simples dos meios sobre comprimento da maior raiz dentro do genótipo mesclada.	53
Tabela 18. ANOVA para efeitos simples dos meios sobre massa fresca da raiz.	55
Tabela 19. Efeito simples dos meios sobre massa fresca da raiz dentro de genótipo azul.....	55
Tabela 20. Efeito dos meios sobre massa seca da raiz em cada meio pelo teste de Games-Howell.....	56
Tabela 21. ANOVA para efeitos principais e interações em massa fresca total.....	58
Tabela 22. Efeito dos meios sobre massa fresca total.....	59
Tabela 23. Efeito do genótipo sobre massa fresca total.....	60
Tabela 24. Efeito simples dos meios sobre massa fresca total dentro de genótipo azul.....	60
Tabela 25. ANOVA para efeitos e interações sobre massa seca total.	61
Tabela 26. Efeito dos meios sobre massa seca total.	61
Tabela 27. Efeito do genótipo sobre massa seca total.....	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A4 - meio nutritivo A4 (Cardoso, dados não publicados)

ABA – Ácido abscísico

AIB – Ácido Indolbutírico

AIPH - International Association of Horticultural Producer

ANA– Ácido naftalenoacético

ANOVA - Análise de variância

ApMV - Vírus do mosaico da maçã

B5 - meio Gamborg et al., 1968

BAP ou BA – 6- Benzilaminopurina

CV– Coeficiente de variação

DIC - delineamento inteiramente casualizado

DMS - diferença mínima significativa

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou ensaio de imunoabsorção enzimática

F – Valor da análise de variância

ha - hectares

LS - Linsmaier and Skoog, 1965

MS – Meio nutritivo de Murashige & Skoog, 1962

MS 1/2– Meio nutritivo de Murashige & Skoog com metade da concentração dos sais

OEC - Observatory of Economic Complexity

PNRSV - Vírus do anel necrótico da ameixa

QL - Meio nutritivo de Quoirin e Lepoivre, 1977

SH - Meio nutritivo de Schenk e Hildebrandt, 1972

VS - Meio nutritivo de Van der Salm, 1994

WH - Meio nutritivo de White, 1962

WPM – Meio nutritivo de Wood Plant Medium, LLOYD & MCCOWN, 1980

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Botânica do gênero <i>Rosa</i>	15
2.2. Importância econômica na floricultura mundial	15
2.3 Características do mercado de rosas	17
2.4 Sistemas de propagação de rosas	19
2.4.1 Estaquia	21
2.4.2 Enxertia	24
2.4.3 Propagação pelo método 'Stenting'	26
2.4.4 Micropropagação	27
3. OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.2 Delineamento Experimental	35
4.3 Preparo dos meios de cultura	35
Fonte: Autor	37
4.4 Instalação e disposição do experimento	38
4.5 Avaliações	39
4.6 Forma de análise dos resultados	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Efeitos dos meios sobre a parte aérea das plântulas in vitro	42
5.1.2 Comprimento da maior brotação	44
5.1.3 Massa fresca de parte aérea	45
5.1.4 Massa Seca de Parte Aérea	46
5.2 Efeitos do genótipo e meio de cultura sobre o desenvolvimento de raízes de roseiras cultivadas in vitro	47
5.2.1 Comprimento da Maior Raiz	51
Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.	53
5.2.2 Massa fresca da raiz	54
5.3 Massa Fresca total	58
5.4 Massa seca total	61
6. CONCLUSÃO	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

A floricultura é apontada como uma das mais importantes atividades que impactam sobre a economia brasileira, responsabilizando-se por 209.000 empregos diretos. Hoje em dia, o Brasil mantém um cultivo superior a 2500 espécies, distribuído entre aproximadamente 8 mil produtores de flores e plantas (IBRAFLO, 2021).

Nesse âmbito, as rosas são as flores mais prestigiadas na floricultura, principalmente as rosas de corte, muito comercializadas hoje em todo o mundo. A propagação da roseira é desenvolvida por meio da estaquia e enxertia. Contudo, considerando-se que o mercado consumidor na área da floricultura está cada dia mais exigente, os produtores têm investido nas mais avançadas técnicas de produção e comercialização com o intuito de alcançar um produto de qualidade (MARREIROS, 2010).

A cultura de tecidos de plantas tem ocupado uma posição de destaque na recuperação de plantas isentas de vírus e outros agentes causadores de patologias, na propagação comercial de plantas, no melhoramento genético e na conservação do germoplasma (CARVALHO et al. 2009).

Ao longo do processo de micropropagação, são incorporados reguladores de crescimento ao meio de cultivo que estão diretamente ligados no controle da divisão celular e através desse processo, torna-se possível obter um produto de melhor qualidade com maior número de gemas laterais e mais curtas, constituindo plantas mais compactas do que as produzidas por estaquia (DINIZ et al., 2014).

Escolheu-se essa temática, por se tratar de um assunto que possui grande relevância social visto que, ainda que importante no cenário econômico brasileiro, o ramo da produção de roseiras necessita de um maior investimento em pesquisas e programas de melhoramento de rosas no país.

Em face do exposto, o presente trabalho de conclusão de curso se propõe a responder ao seguinte questionamento: De que maneira a qualidade da nutrição influencia no processo de desenvolvimento dos genótipos?

Dispondo-se a responder à questão norteadora supracitada, definiu-se como objetivo geral, desenvolver um estudo sobre o processo de enraizamento de genótipos de roseira *in vitro* baseado somente na nutrição vegetal, sem uso de auxinas e em diferentes meios de cultura e como objetivos específicos, demonstrar se existe diferença nos processos de enraizamento, de acordo com o meio de cultura e a fonte

de nitrogênio fornecida aos genótipos de roseiras e compreender se o enraizamento é possível somente com a nutrição in vitro, sem adição de reguladores vegetais sintéticos ou naturais.

A referida pesquisa encontra-se estruturada em tópicos que, foram organizados da seguinte forma: No primeiro tópico, aborda sobre a Botânica do gênero Rosa, descreve sobre sua importância econômica na floricultura mundial e características do mercado de rosas, os pontos característicos sobre os Sistemas de propagação de rosas, tecnologias recentes e a descrição do experimento instalado em laboratório para coleta e análise de dados, seguido por análise estatística e discussão de resultados do mesmo.

No que diz respeito à metodologia, esse trabalho é feito por meio de um levantamento de referências teóricas já analisadas e publicadas através de escritos e eletrônicos como livros, e-books, artigos científicos e web sites, seguido pelo experimento com três genótipos de roseiras instalado no laboratório de fisiologia vegetal e cultura de tecidos da UFSCar.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Botânica do gênero *Rosa*

As rosas são flores muito admiradas em todo o mundo em virtude das suas características vegetativas e florais, bem como, devido à grande diversidade de cores, tamanhos e fragrâncias. Sua origem se encontra na Ásia Central, África e Europa (Barbieri; Stumpf, 2005). Elas pertencem à família Rosaceae, que abriga 95 gêneros (Hao, et al., 2019) e cerca de 30.000 espécies, sendo algumas delas de grande importância na horticultura.

Pertence a essa mesma família, além de rosas usadas como ornamentais, muitas espécies utilizadas na fruticultura como maçã, pera, as rosáceas de caroço - pêsego, nectarina e ameixa (Hummer e Janick, 2009), assim como, morango, amoras e framboesas (Glimn-Lacy e Kaufman, 2006). As roseiras pertencem à subfamília Rosoideae (Sargent et. Al., 2007; Zandi, 2015) e ao gênero *Rosa* L. (*Rosa*), configurando plantas perenes cujo caule é do tipo lenhoso (Khan et al., 2004; Remay et al., 2009) e seu hábito de crescimento pode ser ereto, arbustivo ou trepador (Barbieri; Stumpf, 2005).

O número de espécies aceitas dentro do gênero fica por volta de 149 (The Plant List, 2022), mas, somente oito dessas (De Vries e Dubois, 1996; Raymond et al. 2018), têm sido utilizadas com frequência no melhoramento genético dando origem a parte das mais de 37.000 cultivares já registradas no mundo desde 1930 (American Rose Society, 2019), oriundas de cruzamentos e retrocruzamentos (Kole, 2011), e com uso mais frequente na horticultura (Barbieri; Stumpf, 2005).

Essas oito espécies utilizadas são *Rosa chinensis*, *R. wichuraiana*, *R. odorata*, *R. moschata*, *R. damascena*, *R. multiflora*, *R. foetida*, and *R. rugosa* (Eagle, 2010) e para as rosas comerciais é adotado o nome *Rosa hybrida* a fim de designar os muitos híbridos cultivados ao redor do mundo.

De acordo com Marriott (2017), o melhoramento de rosas é um dos mais intensos entre as culturas ornamentais, principalmente devido às muitas cultivares criadas nos últimos 200 anos.

2.2. Importância econômica na floricultura mundial

Na Horticultura, que inclui a produção de frutas, hortaliças, plantas medicinais, cogumelos e flores, a floricultura é uma das indústrias com maior lucratividade (Xia et al., 2006) e número de pessoas empregadas por unidade de área de cultivo, sendo de grande importância social e econômica, se comparada a outros produtos agrícolas.

A produção mundial de flores de corte, folhagens, plantas de vaso, bulbos e materiais de propagação e flores para ornamentação de canteiros foi estimada em US\$ 80 bilhões em 2020. A área total de cultivo estimada para tal é de cerca de 650.000 ha. Já a produção de mudas de árvores e arbustos entre outras espécies perenes e lenhosas em viveiros corresponde à US\$ 45 bilhões em cerca de 1.110.000 ha de área plantada. Portanto, o valor total do mercado de floricultura chega a US\$ 90 bilhões (World Floriculture Map, 2021). As flores de corte mais importantes nesse mercado são as rosas, seguidas por crisântemos e cravos, respectivamente (Naing et al., 2016; OEC, 2019; World Floriculture Map, 2021).

Os maiores produtores e exportadores de flores de corte são Holanda, Colômbia, Equador, Quênia, e Etiópia, rendendo US\$ 4.08 bilhões, US\$ 1.47 bilhões, US\$881 milhões, US\$ 616 milhões e US\$ 238 milhões em exportações respectivamente (OEC, 2019), entre aproximadamente mais de 90 países que praticam alguma atividade ligada à floricultura (IFTS 2004). Já Estados Unidos, Alemanha, Holanda, Reino Unido e Rússia são os maiores importadores de flores de corte, movimentando valores da ordem de US\$ 1.87 bilhões, US\$ 1.23 bilhões, US\$851 milhões, US\$ 842 milhões e US\$563 milhões respectivamente (World Floriculture Map, 2021; OEC, 2021).

As rosas podem ser cultivadas para extração de óleos e substâncias para as indústrias de perfumaria e farmacêutica (Zlesak, 2006), destinadas para fabricação de chá (Ha et al., 2020), para uso culinário ou como planta medicinal (Boskabady et Al., 2011), fortemente ligada ao conhecimento tradicional de muitos países. Porém, a maior importância comercial das rosas (*Rosa hybrida* L.) são as suas flores ornamentadas e coloridas, colocando esse grupo de plantas como um dos de maior importância econômica mundial dentre outras espécies comercializadas (Khosh-Khui e Teixeira da Silva, 2006; Flower Council of Holland, 2015), principalmente nos mercados de flores de corte (World Floriculture Map, 2021). Anualmente, cerca de 10 bilhões de hastes de rosas são comercializadas no mundo (AIPH 2016).

Os maiores produtores e exportadores de rosas de corte são Holanda, Colômbia, Quênia, Equador e Etiópia (World Floriculture Map, 2021; AIPH 2016),

enquanto que os países que mais importam rosas são a Holanda (19%), Alemanha (16%), França (8.2%), os Estados Unidos (8%) e a Rússia (6.9%) (OEC, 2017). De acordo com Eurostat (2018) Reino Unido e Espanha também são grandes importadores. Na economia da União Europeia a rosa é a flor de corte mais importante também (CBI, Ministério das Relações Exteriores, 2017). Os principais países que forneceram rosas de corte para a União Europeia em 2017 são Quênia, Etiópia, Equador e Colômbia, com 51%, 20%, 17%, e 5% na ordem (García, 2018).

De acordo com a AIPH (2016), Holanda, Quênia, e Etiópia exportam principalmente para a Europa, enquanto que as importações da América do Norte são predominantemente do Equador e Colômbia (AIPH, 2016).

Os maiores países produtores em área são Índia (61000 ha) e China (14348 ha), Equador (5472 ha), Colômbia (2465 ha), e Quênia (2164 ha) (AIPH 2015). Contudo Índia e China não estão entre os exportadores devido a sua produção ser destinada principalmente ao mercado interno (LEUS et al., 2018).

Em concordância, há países que atuam como grandes exportadores e importadores simultaneamente. São países que importam grandes quantidades de flores de outros países produtores e exportam outra vez. Essa prática de re-exportar pode fazer a cadeia de valores crescer.

A Holanda é o principal país exportador e importador da União Europeia (Eurostat, 2018), inclusive de rosas de corte (Ministério das Relações Exteriores, 2017). Mais de 40% da produção mundial de flores passa pela Holanda antes de ser exportada (World Floriculture Map, 2015). A Holanda foi responsável por movimentar cerca de US\$3.46 bilhões (43%) em exportações de flores de corte, contudo cerca de 37% das flores foram importadas do Quênia e então re-exportadas (OCE, 2017). Cerca de 95% das importações de rosas para a Holanda são exportadas novamente (Escritório Comercial do Equador em Rotterdam, 2017; García, 2018).

A Holanda possuía aproximadamente 850 ha em produção de rosas em 2004 e em 2016 essa área havia sido reduzida para 238 ha (Royal Flora Holland 2016). Essa diferença pode ser devida principalmente a um maior protagonismo de países da África e América Latina no mercado de rosas, com mão de obra mais barata e condições climáticas mais estáveis (García, 2018).

2.3 Características do mercado de rosas

A rosa é uma das flores de corte mais importantes, devido à diversidade de variedades (Galeriani et al., 2020), além de ser amplamente admirada por sua beleza. Foi utilizado em diferentes situações ao longo do tempo, como medicamento, em cerimônias sociais e religiosas (Krusmann, 1981), como símbolo de poder (Barbosa, 2003), e também de beleza e amor ligados à antiga deusa romana Vênus (Buchmann, 2016).

As rosas cortadas, como em geral as flores de corte, são consideradas um produto com demanda sazonal, portanto, a demanda aumenta e se concentra em determinados dias e feriados do ano. O Dia dos Namorados é uma das datas mais importantes para esse mercado - sendo as rosas vermelhas as mais comercializadas - seguidas pelo Dia das Mães que promove a venda de rosas cortadas, entre outras flores (Ziegler, 2007; Buchmann, 2016; Indústria de flores na Holanda, 2020). Natal e Páscoa também são datas importantes para o comércio de flores (Flower Industry Statistics, 2016), porém em menor escala.

As características importantes para produtores, comerciantes e consumidores – inerentes a escolha da cultivar são principalmente a longevidade da flor, o chamado tempo de prateleira, tempo de vaso, e seu desempenho durante o transporte e armazenamento (Orlikowska et al., 2018).

A produtividade, associado ao número de botões florais produzidos por metro quadrado e tempo de cultivo, é também um fator primordial para produtores de flores de corte. Para o consumidor, pontos prioritários se resumem principalmente ao aspecto visual da flor, como a cor e forma de abertura da flor (Yue et al., 2011; Grygorczyk et al., 2014; Orlikowska et al., 2018; Berki-kiss e Menrad., 2019), juntamente com características extrínsecas à flor, como preço, embalagem e modelo de produção com menor impacto ambiental, mais socialmente justo e responsável, importantes para alguns grupos de consumidores finais (Bernués et al., 2012; Berki-kiss et al., 2020).

Já as características mais importantes em termos de classificação de hastes de rosas para o mercado são: comprimento de haste, espessura da haste, comprimento do botão, ponto de abertura do botão. Além disso, é importante que as hastes não possuam danos mecânicos nem danos causados por insetos ou doenças. (Cooperativa Veiling Holambra, 2009).

Outro ponto que também atrai a atenção e o interesse do mercado consumidor é a novidade, uma flor desenvolvida com algum diferencial (cor, tamanho, fragrância, formato) não disponível anteriormente (Oktisu et al., 2018).

Nesse contexto, a inovação tem sido um dos principais desafios encontrados pelos melhoristas de rosas visando a produção de novas cultivares. Entre as novidades recentes estão as rosas com flores de coloração azuladas, produzidas por melhoramento convencional, ou engenharia genética a partir do gene F3'5'H de amor-perfeito "*pansy*" e *Torenia*, que codifica enzimas associadas a antocianidinas do tipo delphinidinas, como a e que resulta na coloração azul em flores (Katsumoto et al. 2007; Noda, 2018) sendo desenvolvida e comercializada desde 2009 como cv. 'Applause' pela Suntory (2009).

2.4 Sistemas de propagação de rosas

Roseiras podem ser propagadas por diferentes técnicas, entre elas as técnicas de germinação de sementes e técnicas de propagação vegetativa, como estaquia e enxertia.

Embora a propagação de rosas pela germinação de sementes seja possível, algumas características desejadas na floricultura e das plantas germinadas dificultam em muito a sua adequação aos atuais sistemas de cultivo altamente tecnificados e lucrativos. Uma característica considerada um limitante é a alta variabilidade fenotípica das plantas originárias desse sistema de propagação, em especial pela alta heterozigosidade associada as suas cultivares (Food and Agricultural Research and Extension Institute, 2018).

Ainda que essa característica seja desejável no melhoramento genético visando à obtenção de novas cultivares, a alta variabilidade genética é um fator crítico e que limita a produtividade e padrão mínimo de qualidade de flores em larga escala, no qual uniformidade e homogeneidade são fatores preponderantes para obtenção de lucro. Outros aspectos associados a limitação da reprodução, como a presença de híbridos estéreis ou de baixa compatibilidade, que resultam no baixo pegamento de frutos, e fatores associados a dormência, que levam a baixa taxa de germinação de sementes (Abdolmohammadi et al. 2014), são fatores que dificultam a produção de mudas em escala visando atender a produção comercial de rosas.

Mudas jovens provenientes de sementes também são mais facilmente afetadas por algumas doenças que causam tombamento, como *Botrytis*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* e *Fusarium* (Royal Horticultural Society, 2020), além do fato de poder ocorrer a perda de resistência a determinadas doenças devido a segregação genética nesse tipo de propagação.

Muitos híbridos comerciais também não produzem sementes, podendo esse fato ser contornado parcialmente com métodos de cruzamento e escolha de genótipos parentais (SHIVAKUMAR, 2019).

Outro empecilho é a dormência de sementes, ou seja, a não germinação das sementes mesmo quando todos os fatores necessários a esse processo estão presentes e são adequados (IPEF, 1997).

A dormência se manifesta de forma heterogênea em diferentes espécies, genótipos, e mesmo em sementes provenientes de uma mesma planta (Meyer, 2008). A origem deste problema é diversa, podendo ser ambiental e genética (GUDIN ET AL., 1990; BOSCO ET AL., 2015). Em rosas a dormência de sementes é exógena e endógena (ALP ET AL., 2008), frequentemente sendo devido a resistência mecânica e substâncias presentes no pericarpo (BO ET AL., 1995; ZHOU ET AL., 2009).

Alguns tratamentos podem ser adotados para superar a dormência, principalmente tratamentos que reduzam a resistência mecânica (Franks et al., 2007), como escarificação física ou química, variação de temperaturas (Fowler e Bianchetti, 2000), uso de bactérias promotoras de crescimento (Zhou et al., 2008) e resgate de embriões in vitro (Abdolmohammadi et al. 2014) que possibilitam driblar o problema. A estratificação, ou seja, tratamento com baixas temperaturas e ambiente úmido costuma ser eficaz para a quebra de dormência de sementes de rosa (Haouala et al., 2013), pela promoção do desenvolvimento do embrião com manutenção da umidade.

A juvenilidade é outro desafio na obtenção de rosas a partir de sementes. O período de juvenilidade é a fase entre a germinação e o momento em que a planta começa a produzir flores e frutos (Embrapa, 2010), quando o vegetal tem um desenvolvimento vegetativo muito rápido, sem, no entanto, entrar em reprodução. Em rosas esse período pode durar de um a dois anos (Iwata, 2012), contudo com uso de técnicas de propagação vegetativa o período para ocorrência e início da floração pode ser reduzido para apenas alguns meses.

Dessa forma, embora a propagação por sementes seja desejável visando a obtenção de novos genótipos de rosas por meio do melhoramento genético, a

propagação vegetativa (Khosravi et al., 2007) é aquela utilizada comercialmente visando a propagação em larga escala de cultivares selecionadas e de interesse para a produção de flores de corte, sendo a principal forma de manter sua genética e seu genótipo sem variações, pois dessa maneira são obtidos os cultivos clonais, com indivíduos idênticos a planta que serviu como matriz (EMBRAPA, 2003) .

Os sistemas de propagação vegetativa mais comuns e utilizados no cultivo de rosas são a estaquia e a enxertia (Nizamani, 2016). Outro sistema que vem sendo adotado é a micropropagação, que pode produzir numerosos clones, em um tempo relativamente curto, e em um ambiente muito controlado, com obtenção de plantas livres de fitopatógenos (LIDDER; SONINNO, 2012).

2.4.1 Estaquia

A estaquia é um dos sistemas de propagação mais comuns em plantas (Anderson e Woods, 1999), em que o vegetal é propagado por meio de estacas, que podem ser de origem de caules, folhas ou mesmo raízes. As estacas devem ser colocadas em substratos, que retenham umidade (Couvillon, 1988), tenham boa drenagem, sejam porosos, de baixa densidade e livre de patógenos, pragas e sementes de outras espécies (KÄMPF et al., 2006) para a emissão de raízes adventícias e o desenvolvimento em uma planta completa (Hartmann et al. 2002). Diversos materiais podem ser utilizados como substrato, em uso solo ou com proporções combinadas, e ainda pode-se optar por misturas comerciais já prontas disponíveis no mercado (ZANÃO et al., 2016). Alguns substratos muito comuns são: areia, vermiculita, turfa, musgo esfagno, fibra de coco, casca de arroz carbonizada, pinus, etc.

Para estacas de rosa pode ser feito o uso de solo com adição de matéria orgânica, em uma proporção de 2:1, e para mini-rosas pode ser preparada uma mistura de solo com fibra de coco em uma proporção 1:1 (FAREI, 2018). Ritter et al. (2018) avaliaram o efeito de três diferentes substratos no enraizamento das cultivares de rosa Tineke e Natal Briar. Os substratos utilizados foram casca de arroz carbonizada, fibra de coco, e TN Gold®, um substrato comercial com esfagno, vermiculita expandida, calcário dolomítico, gesso agrícola, NPK e micronutrientes. O substrato com melhor desempenho para ambas as cultivares foi casca de arroz

carbonizada, com taxa de 81% de enraizamento de estacas, seguido por fibra de coco, com 61% (Ritter et al., 2018).

Em roseiras a estaquia é feita a partir de estacas caulinares, sem nenhuma ou com poucas folhas presentes na estaca. É feito o corte em um ramo da planta, e o extremo que for entrar em contato com o substrato pode ter seu corte feito em bisel, para aumentar a área de contato da planta com o meio e promover o crescimento de raízes. Segundo Matloobi et al. (2018) o tempo para brotação e diâmetro de flor em rosas estaqueadas tem relação com a idade da planta, sendo que as plantas mais novas (com menos de três anos) brotam mais cedo, em até sete dias, e apresentam flores de maior tamanho (32mm), em comparação com estacas obtidas de roseiras mais velhas (com três anos ou mais).

As gemas axilares de roseiras também se comportam de modo heterogêneo umas em relação às outras de acordo com sua posição ao longo do caule (Zamski et al., 1985). Segundo Bris et al. (1997) estacas contendo as gemas superiores iniciam seu crescimento e produção de brotos mais rápido em comparação com gemas inferiores que permanecem dormentes. Zanão et al., (2016) constataram o mesmo efeito, afirmando que estacas apicais tem melhores resultados de propagação e brotação que estacas da posição mediana das plantas. Esses efeitos podem estar associados aos tecidos mais jovens e mais ricos em auxinas que aqueles em posições inferiores na planta.

Existem diversos outros fatores que interferem no enraizamento de estacas, tanto endógenos como exógenos, sendo determinantes na indução e no desenvolvimento das raízes adventícias e, por conseguinte no próprio desenvolvimento do vegetal (Rosier et al., 2006; Hartmann et al., 2002).

A formação das raízes adventícias tem início com a desdiferenciação de células que alteram seu desenvolvimento para gerar células de um potencial sistema radicular. A segunda etapa é a iniciação das raízes, quando as células induzidas passam por sucessivas divisões celulares. Na etapa final, ocorre o alongamento celular, que aos poucos dará origem a tecido vascular e finalmente, raízes (Hartman et al. 2002).

Em geral, o processo de desdiferenciação e indução é obtido com altas concentrações de auxinas (Hartman et al. 2002), sendo que o alongamento das células das raízes (crescimento) ocorre em situação contrária, de baixas concentrações de auxinas (Thimann, 2008).

As auxinas são importantes hormônios vegetais associados ao estímulo do enraizamento de estacas, e seu uso se dá comercialmente pelo uso de fitorreguladores, produtos sintéticos análogos aos hormônios vegetais, aplicados à planta, e que são utilizados para acelerar a indução de raízes adventícias (Jarvis e shaheed 1986; Galavi et al., 2013), aumentando as taxas, a velocidade e a qualidade do enraizamento obtidos em estacas (Kasim and Rayya, 2009; Kumari et al.2010; Pandey et al. 2011). Entre as auxinas com melhores resultados no enraizamento de estacas estão o ácido indolacético (IAA), o ácido naftaleno acético (NAA) e o ácido indol butírico (IBA) (Randhawa and Mukhopadhyay, 1994; Yusnita et al., 2018).

A aplicação de IBA tem se apresentado como uma das mais eficientes para formação das raízes adventícias em estacas (Cristofori et al., 2010), incluindo estacas de roseiras (Ercişli, 1999; Hartmann et al., 2002). De acordo com Nasri et al.(2015) o número, comprimento e diametro de raízes de determinadas cultivares é influenciado por aplicações de IBA. Isso porque o IBA é mais rapidamente convertido em IAA, que nos tecidos vegetais costuma sofrer oxidação por peroxidases ali presentes. Contudo, o IAA advindo do IBA não passa por esse processo, permanecendo no local do corte (Epstein,1984), e contribuindo para o enraizamento. Inicialmente o IBA foi tido como uma auxina sintética (Zimmerman and Wilcoxon, 1935), até que foi comprovada também a sua ocorrência natural em folhas e sementes de milho (Epstein et. al., 1989) e em diversas outras espécies (Korasick et al., 2013).

Os efeitos positivos do IBA no enraizamento de estacas de rosas também foi observado em propagação por estaquia de *Rosa hybrida* cv. Dolce Vita, sendo que a concentração de 1500-3000 mg.L⁻¹ corresponderam à maior porcentagem de estacas enraizadas (95.8%-97.9%) e qualidade de enraizamento, sendo esses resultados também positivos para o desenvolvimento da parte aérea das plantas estaqueadas (Pourghorban et al. 2019).

A taxa de enraizamento em estacas de roseira cortadas em diferentes estádios fenológicos foi comparada por Monder et al. (2018), sendo os seguintes estádios verificados: (1) botões florais fechados, (2) flores abertas, (3) imediatamente após a queda das pétalas e (4) 7-14 dias após queda das pétalas. Com dez semanas de enraizamento, uma das cultivares avaliadas não mostrou diferenças de acordo com o estágio fenológico em que foi preparada a estaca, e outras três cultivares obtiveram melhores taxas de enraizamento a partir de estacas cortadas no momento em que os

botões florais ainda estavam fechados, confirmando a hipótese de que estacas mais jovens estariam mais propensas a emissão de raízes adventícias.

Ghazijahani et al. (2018) testaram alternativas ao uso de auxinas no processo de enraizamento de estacas de rosas, pulverizando ácido cítrico e ácido málico em três diferentes concentrações: 3, 6, e 9 mM antes de ser feita a estaquia de rosas. Segundo os autores as taxas de enraizamento foram significativas em todos os tratamentos, contudo o comprimento das raízes só aumentou nos tratamentos com ácido cítrico.

O sistema de estaquia tem sido muito utilizado para roseiras, entretanto pode ser lento e não garantir plantas livres de doenças (Pati et al., 2006). Assim como na propagação por sementes, algumas doenças como *Botrytis*, podem afetar estacas jovens, resultando em tombamento. Outro problema é o aparecimento da mosca sciara, que passa a se alimentar da base da estaca. Essas situações podem ser evitadas em grande parte com higiene e aeração em caso de doenças, e com checagens frequentes para evitar aumento de populações no caso de pragas (Royal Horticultural Society, 2020). Outra opção é o controle biológico com liberações de ácaros predadores, tais como *P. macropilis* e *N. californicus* (Souza-Pimentel, 2014). Além disso, a estaquia não é recomendada para algumas cultivares híbridas, pois o sistema radicular pode não ter vigor suficiente, sendo mais indicado em tais casos, a técnica da enxertia. O tempo para o enraizamento também difere, podendo levar até um mês para algumas espécies e cultivares enquanto que para outras, 3 a 4 meses no mínimo são necessários, visando o estabelecimento da planta (Food and Agriculture Research and Extension Institute, 2018).

2.4.2 Enxertia

A enxertia é uma técnica de propagação, especialmente utilizada em espécies florestais, frutíferas e ornamentais, e que consiste na fusão de dois indivíduos da mesma espécie ou de espécies correlatas, porém geneticamente diferentes entre si. A espécie ou cultivar cuja base do caule fica em contato com o solo e que possui o sistema radicular recebe a denominação de porta-enxerto, e a parte aérea da planta, responsável pela constituição principal do caule, folhas, flores e frutos consiste na espécie conhecida como enxerto ou copa.

O porta-enxerto, portanto, é responsável por promover a absorção de água e a nutrição mineral e o enxerto, a fotossíntese e a produção de seiva elaborada. Geralmente, os porta-enxertos são obtidos de sementes e os enxertos de brotações/ramos/borbulhas de matrizes selecionadas sendo, portanto, provenientes de clonagem, mantendo a identidade clonal das plantas consideradas enxertos, responsável pela produção das flores. As plantas utilizadas nesse processo não se unem completamente, as células não se fundem e se tornam híbridas como ocorre no melhoramento genético, mas a seiva circula como se fosse um organismo só, conectando as células do porta-enxerto com as do enxerto (Embrapa, 2005).

Apesar dos porta-enxertos ainda serem produzidos principalmente utilizando sementes, desde a década de 80 há esforços significativos para que os porta-enxertos de diferentes espécies sejam produzidos por técnicas de cultivo *in vitro*, promovendo a clonagem de porta-enxertos de alto desempenho agrônômico (GOLOSIN, 1985).

Atualmente a junção de porta-enxertos mais eficientes, com técnicas avançadas de micropropagação, a exemplo do uso de biorreatores de imersão temporária tem viabilizado a utilização dessa técnica visando a produção em larga-escala e a preços competitivos (Godoy et al. 2017; Nasri et al. 2019). Os porta-enxertos de rosa também podem ser propagados por meio da estaquia, sendo obtidos de variedades rústicas (Franzon et al., 2010; Pizetta, 2006). Para a formação das raízes adventícias no porta-enxerto de rosas pode-se fazer o uso de auxinas (Galavi et al., 2013). Outra opção para a propagação mais rápida dos porta-enxertos é a micropropagação (Castillo et al., 2015), que possibilitam maior uniformidade nas estacas obtidas, em relação a propagação *ex vitro* (Ambros et al., 2016).

A enxertia traz como principal contribuição aos cultivos, a possibilidade de fundir espécies ou genótipos com maior resistência a fatores abióticos e bióticos relacionados ao solo, como estresse hídrico e patógenos de solo, com espécies ou cultivares com características de alta produtividade e qualidade de madeira, flores ou frutos. A precocidade, o aumento na produção, maior resistência ao estresse e a colheitas sucessivas também estão entre os benefícios, sendo uma técnica bastante consolidada (Cheng and Roose, 1995; Lee; Sakata; 2007; Mudge, et al. 2009).

O porta enxerto não raramente é escolhido de maneira a modificar, ao menos em parte a fisiologia vegetal, e melhorar a absorção de nutrientes e o acúmulo de biomassa na planta (Gainza et al, 2015; Tandonet et al, 2010). Dessa forma, a técnica da enxertia possibilita usufruir características do porta enxerto e a partir dele obter

resultados fenotípicos na parte aérea (Albacete et al., 2009). O porta enxerto também pode ser escolhido de forma a solucionar problemas específicos de uma espécie ou região. Como exemplo, existem porta-enxertos mais adaptados a solos salinos ou regiões com maior propensão à ocorrência de estresse hídrico (Kumar, et al., 2017).

A enxertia tem sido uma das técnicas mais utilizadas na produção de mudas de rosas visando a produção comercial de flores. Segundo Short e Roberts (1991), o uso de estaquia é mais comum para a propagação de mini-roseiras, enquanto que em outras roseiras utilizadas como flores de corte, a enxertia tem sido a técnica mais utilizada. São utilizados com maior intensidade os porta-enxertos das espécies *Rosa canina* 'Inermis' and *Rosa multiflora* 'Simplex'. Szmagara et al. (2018) relataram que a produtividade e qualidade de *Rosa* cv. "Red House", um híbrido de flores chá, ao longo de três anos consecutivos em cultivo protegido sem aquecimento, variou entre dois porta-enxertos diferentes, sendo que a espécie *R. multiflora* genótipos I e II, demonstraram desempenho superior a *R. canina* 'Schmid's Ideals' em relação ao número de flores cortadas por planta, porém sem efeitos na qualidade das flores e hastes florais produzidas.

Otiende et al. (2017) estabeleceram que na propagação, por estaquia, de dois porta enxertos de roseiras, chamados 'Rosa Progress' e 'Natal Briar', as porções apicais da planta tem as melhores taxas de enraizamento, sendo atribuído esse melhor enraizamento à quantidade de minerais e açúcares nessa região da planta.

2.4.3 Propagação pelo método 'Stenting'

Apesar dessas separações por método, uma técnica de propagação muito reportada atualmente em rosas, funde os métodos de estaquia e enxertia, sendo a esse método atribuído o nome 'Stenting', quando a estaquia e a enxertia são estabelecidas conjuntamente, sendo que a ligação entre estaca e porta enxerto se forma ao mesmo tempo em que o porta enxerto inicia e desenvolve suas raízes (Kroin, 2016).

Pourghorban et al. (2019), utilizando a técnica de 'Stenting', observaram que o IBA na concentração de 1500 mg.L⁻¹ resultou em maior porcentagem de enraizamento (81.3%), número (9.6), comprimento (3.6 cm) e massa (0.95 g) de raízes dos 'Stentings', resultando também no melhor desenvolvimento da parte aérea dos 'Stentings'. Comparado ao método de estaquia direta, este apresentou maior

porcentagem de estacas enraizadas (95.8%) e número de raízes por estaca (23) que o método de stenting, porém os autores relatam a necessidade de maior número de estudos para conclusões mais robustas.

Também utilizando a técnica de Stenting, Izadi et al. (2014) avaliaram duas espécies utilizadas como porta-enxertos, *Rosa canina* e *Rosa manetti*, em três cultivares de rosas utilizadas como enxerto ou copa, 'Avalanch', 'Dolcevita' e 'Peach Avalanch'. Os autores observaram que o porta-enxerto *Rosa canina* obteve melhor resultados como porta-enxerto somente para a cultivar 'Avalanch', não havendo diferenças em relação as demais (Izadi et al., 2014).

2.4.4 Micropropagação

A micropropagação envolve um conjunto de técnicas baseadas na propagação vegetativa, realizada em condições *in vitro*, sendo a principal alternativa às técnicas de estaquia e enxertia, e que visam a obtenção, em larga escala, de mudas de plantas geneticamente idênticas e livre de pragas e patógenos (Mahmood et al. 2016), com redução significativa do tempo para a obtenção das mudas. Além disso, os métodos de propagação *in vitro* podem ser utilizados auxiliando a manipulação de recursos genéticos e podem ser uma via importante para a conservação de espécies consideradas raras (Bhatia et al., 2002), ou em risco de extinção. No entanto, a maior aplicabilidade da micropropagação tem sido a produção escalonada ou sazonal de mudas para atender o exigente mercado de flores. A micropropagação de rosas é um sistema que possui potencial para produções planejadas, algo importante para um mercado com elevada sazonalidade, tanto de plantio como de colheita devido a datas comemorativas.

O primeiro protocolo bem sucedido de micropropagação de roseiras foi relatado em 1979, por Skirvin, Chu e Hasegawa. Logo seu uso comercial teve início na França, com Delbard (1982), no ano de 1978, quando ele pontuava inúmeras conveniências do sistema.

A maioria dos trabalhos relacionados ao cultivo de rosas *in vitro* tem sido utilizada em investigações sobre efeito de reguladores vegetais na multiplicação e enraizamento *in vitro* (Nowakowska et al., 2019), além de algumas pesquisas voltadas para a fusão de protoplastos, estudo de ocorrência e frequência da variação somaclonal (Zeng et al., 2006) e diferenciação de tecidos (Spangenberg et al., 1998).

De uma forma geral, a micropropagação de roseiras pode ser dividida em quatro fases distintas, o estabelecimento in vitro, no qual tecidos são retirados da planta mãe e inoculados in vitro após um processo de desinfecção superficial dos tecidos com álcool 70% e hipoclorito de sódio em concentrações variadas, seguido da fase de proliferação ou multiplicação das brotações obtidas, enraizamento in vitro e finalmente a aclimatização das plântulas obtidas, em condições de casa de vegetação.

A regeneração de brotações na fase de estabelecimento in vitro pode ocorrer por meio de quatro modelos distintos: 1) indução direta de brotações a partir de gemas axilares ou segmentos nodais; 2) a cultura de ápices caulinares, 3) embriogênese somática ou; 4) organogênese (Carvalho et al., 2006; Lidder e Sonnino, 2012). Além das diferenças nos tipos de tecidos utilizados para cada modelo de regeneração no estabelecimento in vitro, também podem ser observadas diferenças em relação à estabilidade gênica das mudas obtidas, sendo a maior estabilidade obtida utilizando as técnicas 1 e 2 supracitadas (Giri et al., 2004). A técnica número 2 tem também grande aplicabilidade visando a eliminação de vírus (SIM et al. 2019). Algumas técnicas podem ser de maior aplicabilidade para uso como ferramentas biotecnológicas no melhoramento genético (Giri et al., 2003) e conservação de recursos genéticos in vitro (Viana, 1999; Maruyama e Hosoi, 2016).

A micropropagação, embora possua muitas vantagens em relação às técnicas de estaquia e enxertia, apresenta como principais desafios, as dificuldades relacionadas ao amarelecimento prematuro de folhas, estômatos não funcionais e necrose apical no caule, que afetam a qualidade do material propagado e as taxas de sobrevivência (Debergh e Read 1991), contudo, estudos envolvendo adição de nitrato de prata ao meio de cultura têm se mostrado promissores ao contornar esses desafios (MATOS et al. 2021).

A regeneração e proliferação in vitro de brotações de rosas ocorre devido a totipotência da célula vegetal, associado ao seu cultivo em meio de cultura contendo soluções salinas, carboidratos, vitaminas e aminoácidos, além de um balanço de fitorreguladores para cada fase do cultivo in vitro (Khosh-Khui e Jabbarzadeh, 2005). No estabelecimento de rosas in vitro, o meio MS (Murashigue e Skoog, 1962) é um dos mais utilizados (Vijaya and Satrayana, 1991), contudo $\frac{1}{2}$ MS, SH (Schenk e Hildebrandt, 1972), B5 (Gamborg et al., 1968), WPM ((Lloyd e Mc Cown, 1981), QL (Quoirin e Lepoivre, 1977), WH (White, 1962), LS (Linsmaier and Skoog, 1965), e meio Nitsch's (Nitsch, 1969) também são utilizados, embora com menor frequência

(Tapingkae et al., 2012; Debergh, 1994; Drefahl, 2004; Burrell et al. 2006; Carelli, 2001). Como fonte de carbono para cultivo in vitro de roseiras, podem ser utilizados diferentes açúcares tais como sacarose, galactose, sorbitol, glucose e manitol (Carelli, 2001; Xing et al. 2010). A indução de brotações, por exemplo, precisa de concentrações adequadas de reguladores, que promovem um desequilíbrio hormonal no vegetal, e a resposta da planta, ou seja, o surgimento das brotações (Monfort et al., 2012). No entanto a quantidade requerida de nutrientes varia de acordo com cada espécie (Misawa, 1994).

Auxinas naturais ou sintéticas podem ser utilizadas no meio para a indução de raízes adventícias (Khosravi, et al., 2007). Assim também se comporta um cultivo com citocinina, sendo frequentemente suficiente para o estabelecimento de um cultivo in vitro. Khosravi et al. (2007) demonstraram que com o aumento da concentração de BAP, uma citocinina, aumentava a quantidade de brotações axilares e folhas nos propágulos de *R. hybrida* cv. Iceberg.

Também a combinação de auxinas e citocininas, no mesmo meio se mostrou benéfica para a indução de brotações. BA em concentrações na faixa de 4.4–13.2 $\mu\text{M/L}$ e NAA com concentração na faixa de 0.0216–0.54 $\mu\text{M/L}$ induziram o enraizamento em rosa (Carelli e Echeverrigaray, 2002). Taxas ótimas de indução de brotações, assim como o crescimento e desenvolvimento foi observado com o uso de 2,5-3,0 mg. L^{-1} de BA e 0,1 mg. L^{-1} de IBA em meio MS (Jabbarzadeh e Khosh-Khui, 2005).

Além da formulação de nutrientes e fitorreguladores, podem ser adicionados extratos vegetais ao meio de cultura de cultivo in vitro de rosas, sendo observados resultados positivos decorrentes da adição de água de coco (10% v/v) suplementando meio MS, com aumento das taxas de multiplicação e comprimento de brotos (Chauhan et al., 2018).

Em roseiras o processo de estabelecimento in vitro é sequenciado de acordo com o de Murashige (1974), com pequenas variações. Primeiramente é escolhida a planta matriz que se pretende estabelecer in vitro, então com uma tesoura esterilizada, corta-se um ramo da roseira que possua algumas gemas laterais ao longo de seu comprimento. Suas folhas com inserção localizada no mesmo local que as gemas laterais devem ser removidas (Silva et al., 2019) puxando-as para baixo, no sentido contrário ao seu crescimento, de forma a não danificar a gema ou o tecido ao redor desta.

Então é feita a pré-esterilização, uma desinfecção da haste a ser utilizada, com álcool 70° por cerca de 5 segundos (Lameira et al., 2000). Substituindo a limpeza com álcool, é possível utilizar água e sabão e posterior remoção deste com água corrente (Mirzaei et al., 2019), água corrente sem pré-adição de surfactantes (por 1 a 3 horas), ou ainda o uso de termoterapia durante dez minutos (Lameira et al., 2000). Como as paredes celulares são enrijecidas pela impregnação com lignina (Stewart, 2008) pode ser mais difícil eliminar microorganismos de rosas.

Com ajuda de um bisturi também estéril é feita a segmentação da haste. Cada segmento deve ter uma gema (Silva et al., 2019). Em alguns caso pode-se utilizar o explante contendo a gema apical (Diniz et al. 2014). Elas devem permanecer então, em álcool 70° em um frasco fechado e sob agitação intermitente de 30 a 60 segundos (Ambros et al., 2016; Silva et al., 2019). Passadas para uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) (Mirzaei et al. 2019) ou hipoclorito de cálcio ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) (0,5 até 3%), na qual permanecem por 5 a 30 minutos, de acordo com variações no material (Carneiro, et al; 1998; Lameira et al., 2000). Então os explantes devem ser imersos e lavados cerca de três vezes com água destilada autoclavada por cerca de alguns segundos (Nikbakht et al., 2005). Outras substâncias que podem ser utilizadas de acordo com Nacheva e Ivanova (2017). Com maior eficácia que o hipoclorito de cálcio (principalmente para plantas lenhosas), é listado nitrato de prata (AgNO_3) e gluconato de clorexidina. Além deles, peróxido de hidrogênio, cloreto de mercúrio (HgCl_2), e etanol, são também conhecidos para a esterilização do material vegetal (Nacheva e Ivanova, 2017). A escolha por um método e substância pode variar de acordo com a espécie utilizada, o explante - folha, caule, pétala - e o tipo de tecido também (ex: caule lenhoso), assim como o ambiente anterior da planta. Dessa forma pode ser feita a desinfecção com eficácia e reduzir possíveis danos ao tecido vegetal.

Logo após essa etapa, são retirados os extremos dos explantes, pois o tecido ali localizado pode conter mais contaminante ou estar levemente danificado (Ambros et al., 2016) por estar mais exposto às substâncias da limpeza. É feita então a instalação nos frascos com meio de cultura, formulado a partir de meios de referência de acordo com o objetivo para determinado cultivo in vitro. Dessa forma avalia-se e altera-se a dosagem e presença de determinados nutrientes e reguladores vegetais. Alterações do meio Murashige e skoog (1962) são muito comuns, promovendo a suplementação com outros nutrientes ou com os mesmos em maior quantidade (Ali et al., 2020).

Ambros et al. (2016) estabeleceram um protocolo de propagação *in vitro* de *Rosa canina* - usada como porta enxerto principalmente por sua resistência ao frio – no qual os explantes foram cultivados em meio MS (Murashige e Skoog), com benziladenina (BAP) e ácido indol-3- acético (IAA), em diferentes dosagens e combinações, sendo que as melhores taxas de multiplicação foram identificadas no meio MS contendo 1.0 mg l⁻¹ BA, e a melhor taxa de enraizamento, no meio MS com 1.0 mg l⁻¹ de IAA.

Tawfik et al. (2018) investigaram também um protocolo para propagação em massa de determinado genótipo de rosa ameaçada, *Rosa* spp. cv. Eiffel Tower. Para a multiplicação das rosas, o meio que se mostrou mais adequado foi MS, com 1 mgL⁻¹ BAP e 0,5 mgL⁻¹ de cinetina, já para a melhor taxa de enraizamento o meio ideal foi MS suplementado com apenas com 50 gL⁻¹ de sacarose e PH a 5.5 (Tawfik et al., 2018).

Além do estabelecimento de plantas por meio de explantes nodais e de ápices caulinares, outra forma de micropropagação é a cultura de meristemas. Nessa técnica o meristema sem primórdios foliares é cultivado *in vitro* (Spangenberg et al., 1998). A eliminação de vírus é um dos principais benefícios e motivações para a escolha de tal modelo de micropropagação (Rout et al., 2006; Varveri et al., 2015), isso porque os meristemas dificilmente são infectados por vírus – ou nos quais os vírus dificilmente conseguem replicar como defendem alguns - devido à velocidade de multiplicação celular (Sim, 2006), não vascularização do tecido (Gamborg e Philips, 2013) e seletividade de plasmódios no meristema à determinadas proteínas, e movimento basipetal de vírus (Verma et al., 2014).

Sim et al. (2019) cultivaram em diferentes meios e condições, microápices caulinares (o meristema envolto de alguns primórdios foliares) de 35 genótipos diferentes de rosas na tentativa de eliminar o vírus do mosaico da maçã (ApMV) e o vírus do anel necrótico da ameixa (PNRSV) das cultivares. Vinte cultivares do total sobreviveram, e segundo os autores o melhor meio foi MS com 3% de sacarose, 2,5 µmol de BAP e 0.4 µmol de IAA. De acordo com os autores, após a aplicação de teste ELISA para detecção de vírus, foi constatado que as plantas estavam livres de vírus de ApMV, contudo ainda possuíam o segundo vírus – PNRSV (Sim et al., 2019).

Em síntese, as diversas formas de tornar otimizado o processo de obtenção de rosas, e a pesquisa aplicada ao melhor entendimento da espécie, se justificam frente a importância das rosas no cenário mundial de horticultura, movimentando mercados

internacionais e sendo uma das flores com demanda estável ao longo das décadas. Em face de tal, o presente trabalho objetiva contribuir para à pesquisa relativa à espécie.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um estudo sobre a influência de diferentes meios de cultura no desenvolvimento de genótipos de roseiras in vitro, especialmente a indução e desenvolvimento de raízes adventícias.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do genótipo sobre o enraizamento in vitro de roseiras

- Avaliar o efeito de diferentes formulações salinas de meios de cultura sobre o desenvolvimento in vitro de brotações de roseiras

- Compreender se seria possível induzir e obter raízes adventícias de roseiras sem adição de fitorreguladores sintéticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos Vegetais localizado no CCA/UFSCar – campus Araras (22°18'56" S; 47°23'20" W; 650 m de altitude), do dia 9 de fevereiro de 2021 ao dia 30 de março de 2021. Foi feita uma repetição completa do experimento no período de 5 de agosto de 2021 a 30 de setembro de 2021. Por se tratar de um ambiente controlado, todas as variáveis de temperatura, umidade, iluminação e acomodação dos materiais foram similares em ambos os períodos. A temperatura permaneceu na faixa de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, o fotoperíodo foi de 16/8 horas e os experimentos foram mantidos sob luz branca fluorescente de 2500 lux.

O experimento foi repetido por duas vezes, sendo que as análises dos dados foram feitas sobre todas as repetições de uma vez, assim cada experimento contou com 5 repetições para cada tratamento, mas a análise foi feita sobre 10 repetições (1ª instalação e 2ª instalação juntas).

4.1 Material Vegetal

Foram utilizadas três variedades distintas de rosas, identificadas como Rosa Mesclada, Rosa Alaranjada e Rosa Azulada, obtidas através do mercado de Flores do CEASA em Campinas. No momento da instalação dos genótipos, foi feita primeiramente uma limpeza com algodão e Riohex 2% (digliconato de clorexidina) seguida de enxague em água corrente. As hastes foram segmentadas em partes menores (priorizando áreas com a presença de gema lateral) e levadas para a câmara de fluxo, então imersas em álcool 70° por cerca de 30 segundos sob agitação, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio 70% acrescida de detergente (3 gotas para cada 100 mL), onde permaneceu por 20 minutos sob agitação constante. As hastes passaram então por três lavagens consecutivas com água deionizada autoclavada, de cerca de 1 minuto cada sob agitação constante. No momento da instalação do material, foi feita a remoção das extremidades das hastes pois devido ao maior contato com a solução de limpeza o tecido foi danificado. Após a retirada desse tecido, os explantes com gemas laterais e apicais foram acomodados em meio de cultura MS1/2 suplementado com cálcio ($664,04 \text{ mg.L}^{-1}$) e de nitrato de prata (1 mg.L^{-1}), para a obtenção nas subculturas de um maior número de plantas para o

experimento principal. Foram realizadas três subculturas até a obtenção da quantidade ideal de plantas.

4.2 Delineamento Experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com esquema fatorial 3x6, com uso de três genótipos de rosa e seis meios de cultura distintos. Cada tratamento contou com cinco repetições, resultando em 90 parcelas. Para a análise, foram consideradas as duas vezes em que o experimento foi instalado como uma única, juntando o total de repetições para cada tratamento, resultando em 10 repetições para cada tratamento, ou 180 parcelas.

4.3 Preparo dos meios de cultura

O preparo dos meios de cultura seguiu uma sequência com o preparo de uma base comum a todos eles, contendo todos os micronutrientes já formulados em soluções estoque nomeadas F, G1 e G2, e vitaminas (solução estoque H). A opção de uso de nutrientes assim preparados foi feita para redução dos possíveis erros e visando garantir a maior homogeneidade dos fatores comuns a todos os meios de cultivo. A tabela 1, a seguir, contém a formulação de micronutrientes (em mg. L⁻¹) de todos os meios de cultura utilizados no presente trabalho. Junto aos micronutrientes descritos na tabela 1, as soluções estoque F e G1 forneceram 0,83 mg.L⁻¹ de KI e 37,3 mg.L⁻¹ de Na EDTA. A solução estoque H forneceu 100 mg.L⁻¹ de myo-inositol, 0,50 mg.L⁻¹ de ácido nicotínico HCL, 0,50 mg.L⁻¹ de piridoxina HCL, 0,10 mg.L⁻¹ de tiamina HCL, 2,0 mg.L⁻¹ de glicina. Foram ainda adicionados 30 g L⁻¹ de sacarose, e 0,10 g L⁻¹ de myo-inositol para finalizar a base comum aos meios.

A partir de então os meios MS, Gamborg B5, WPM, Quoirin & Lepoivre, A4, e MS modificado foram compostos de forma distinta, com as concentrações de macronutrientes descritas na tabela 2. A escolha por cada um desses meios se deu segundo alguns critérios. O meio MS foi selecionado pois de acordo com boa parte da literatura consultada, é o meio que promoveu os melhores resultados para o cultivo in vitro de roseiras, sendo comum apenas a adição de fitorreguladores (Ambros, 2016; Tawfik et al., 2018). Os meios WPM e Quoirin & Lepoivre foram escolhidos devido a

sua indicação para o cultivo de plantas lenhosas, dado que são meios restritivos (GINOVA et al. 2013), e o meio Gamborg B5 por apresentar níveis elevados de NO_3^- e K^+ e baixos de NH_4^+ , e fornecer valores de N totais similares ao meio A4, permitindo compará-los em certo nível (Fior, 2007). O meio A4 (Cardoso, dados não publicados) foi selecionado pois é formulado com fosfato monoamônio, uma alternativa ao nitrato de amônio, de aquisição controlada pelo exército (Villa et al. 2009). O meio MS modificado foi, por fim, escolhido devido aos resultados apresentados por MATOS et al. (2021) na micropropagação de (*Rosa x hybrida*) cv. Sena.

Tabela 1. Composição básica e mantida idênticas para micronutrientes nos seis meios de cultura (B5, WPM, MS, QL, A4 e MSR) utilizados para o cultivo in vitro de roseiras.

Componente	CoCl₂. 6H₂O	CuSO₄.5H₂O	H₃BO₃	MnSO₄.H₂O	Na₂MoO₄	ZnSO₄	FeSO₄.7H₂O
mg.L⁻¹	0.025	0.025	6.20	16.90	0.25	8.60	27.8
Micronutriente fornecido	Co	Cu	Bo	Mn	Mo	Zn	Fe
mg.L⁻¹	2943,1	6362,6	1,1	55000	1164,8	3,5	5584,2

Fonte: Autor.

Tabela 2. Quantidades fornecidas de macronutrientes em cada formulação salina de meio de cultura.

Nutrientes	Meio					
	B5	WPM	MS	QL	A4	MSR
	(mg.L ⁻¹)					
Nitrogênio	374,7	195,8	840,6	458	337,86	420,3
NO₃⁻	1533,0	557,35	1891,38	1717,76	1190	1221,7
NH₄⁺	36,58	90,15	371,87	90,15	88,92	185,94
P₂O₅	77,15	88,65	88,65	140,81	349,85	88,65
K₂O	1.164,60	1.070,29	943,93	931,96	621,89	501,39
MgO	40,7	60,5	60,5	58,8	158,4	60,5
CaO	57,2	36,63	167,7	137,3	167,7	670,2
SO₄²⁻	194,0	689,8	144,1	140,3	377,5	144,1
Cl⁻	36,17	23,16	106,05	0,00075	0,00075	424,2

Fonte: Autor.

O pH dos meios foram todos ajustados para $5,8 \pm 0,05$ e cada a cada um deles foi adicionado $6,4 \text{ g L}^{-1}$ de ágar ao final do preparo individualizado. Todos os meios de cultura foram aquecidos até o ponto de fervura, em forno micro-ondas para completa dissolução do ágar, seguido da distribuição em 15 tubos de ensaio por meio de cultura, com 16 mL cada, totalizando 90 tubos de ensaio. Os tubos de ensaio fechados e identificados foram acomodados em autoclave, e passaram por processo de esterilização por 25 minutos, à temperatura de 120°C , 1kgf/cm^2 .

4.4 Instalação e disposição do experimento

As plântulas doadoras de roseiras utilizadas no experimento já vinham sendo cultivadas em meio de cultura A4 com adição de 1 mg L^{-1} de AgNO_3 , e com cerca de 30 dias de cultivo. Os segmentos nodais utilizados como explantes tinham cerca de 1,0 cm de comprimento contendo uma folha e foram cultivados em cada meio de cultura. Ao todo cada genótipo foi destinada para cinco tubos de ensaio para cada meio de cultura, totalizando 30 tubos por genótipo.

Os tubos de ensaio foram então acomodados de forma aleatória (sorteio) em suporte tipo grade, e alocados em prateleira da sala de crescimento, sob luz branca

fluorescente de 2500 lux, com fotoperíodo 16/8 horas, e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Esse processo foi repetido na segunda vez que o experimento foi instalado, sendo reservado o mesmo local na estante e prateleira para tal.

4.5 Avaliações

As avaliações tiveram início com 13 dias da instalação do experimento, sendo medidos quatro parâmetros, a) número de folhas, b) comprimento da maior brotação, c) número de raízes, e d) porcentagem de plantas enraizadas.

A contagem do número de folhas foi feita considerando o conjunto do trifólio como uma folha inteira, e o tamanho mínimo inicial das plantas para início das avaliações foi 1,0 centímetro.

A segunda avaliação foi realizada com 27 dias de cultura (14 dias após a primeira avaliação), sendo que além dos parâmetros medidos na primeira avaliação, foi acrescentado um quinto parâmetro, e) comprimento da maior raiz, também medido com régua de acrílico graduada em milímetros e centímetros. A terceira e última avaliação foi realizada com 41 dias de cultura (14 dias após a segunda avaliação), e foram mantidos os cinco parâmetros anteriores, sendo que após a medida deles cada explante foi retirado do meio de cultura e pesado em balança analítica, de forma individual para f) obtenção de biomassa fresca total.

Na sequência com auxílio de um bisturi as raízes foram separadas de cada explante e pesadas, também de forma individual, promovendo mais um dado para análise, g) biomassa fresca da raiz. Essas pesagens de massa fresca total e raiz fresca foram realizadas em todas as parcelas seguido da obtenção do valor de h) biomassa aérea fresca pela subtração dos valores de massa da raiz fresca dos valores de massa aérea fresca total.

Após as pesagens, cada planta e suas respectivas raízes já seccionadas foram alocadas em saquinhos de papel pardo, identificados para cada tratamento, e o material foi levado então para estufa de circulação forçada de ar sob temperatura de 70°C por cerca de 72 h, e pesados novamente após esse processo em balança analítica de alta precisão, para obtenção de biomassa seca de parte aérea, biomassa seca de raiz, e biomassa seca total.

Após análise dos resultados obtidos foi definido que apenas as avaliações com 41 dias seriam utilizadas, pois os dados se apresentam mais consistentes. A descrição

dos itens avaliados, dos tempos de avaliação e da forma de avaliação esta descrita na tabela 3.

Tabela 3. Itens, instrumentos, e tempos de avaliação das plântulas.

Item avaliado	Instrumento de avaliação	0 dias	13 dias	27 dias	41 dias
Número de folhas	Contagem	X	X	X	X
Comprimento maior brotação	Régua milimétrica	X	X	X	X
Número de raízes	Contagem		X	X	X
Porcentagem de plantas enraizadas	Contagem e cálculo				X
Comprimento da maior raiz	Régua milimétrica		X	X	X
Biomassa fresca total	Balança analítica				X
Massa fresca da parte aérea	Balança analítica				X
Massa fresca da raiz	Balança analítica				X
Massa seca total	Balança analítica				X
Massa seca de parte aérea	Balança analítica				X
Massa seca da raiz	Balança analítica				X

Fonte: Autor.

4.6 Forma de análise dos resultados

Os resultados encontrados para cada uma das variáveis analisadas e pertencentes a cada tratamento com diferentes meios de cultura, foram sujeitas à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ou Games-Howell, quando houve necessidade. A estatística do presente trabalho foi feita com o suporte do Software Agroestat (BARBOSA, MALDONADO, 2015) e do software R Studio (R CORE TEAM, 2022).

Os dados do experimento passaram por transformação Box-Cox, de Hawkins e Weisberg (2017), com exceção dos dados de Massa Fresca de Raiz e Massa Seca de Raiz. Os dados transformados foram utilizados nos cálculos de variâncias, desvios padrões, coeficientes de variação, DMS, análises de variância e comparações de médias. Apenas os valores de média foram mantidos na escala original.

Nos casos em que as transformações de dados não foram suficientes, devido indícios de falta de normalidade de resíduos e problemas com homocedasticidade, foi feita a remoção de dados pelo próprio software. Foram removidos dados para os seguintes parâmetros biométricos: comprimento da maior raiz e número de raízes.

Os dados de Massa fresca de raiz e massa seca de raiz foram submetidos primeiramente a transformação de postos e em seguida ao teste comparativo de Games-Howell, devido à indícios de falta de normalidade de resíduos e de variâncias que não podiam ser contornados da forma como os outros dados foram.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeitos dos meios sobre a parte aérea das plântulas in vitro

Foi observado que o genótipo Laranja apresentou maior número de folhas em relação aos genótipos azul e mesclada, que não diferiram entre si (Tabela 4). Em relação ao genótipo laranja, dentro do qual foi possível notar efeito de interação (Tabela 5), o meio de cultura WPM foi superior em relação ao meio MS, contudo não diferiu significativamente de QL, B5, MS modificado e A4 (Tabela 6).

Tabela 4. Teste Comparativo de Tukey para número de folhas, comprimento da maior brotação, massa fresca de parte aérea, e massa seca de parte aérea em cada genótipo.

Genótipo	Número de folhas por planta	Comprimento da maior brotação (cm)	Massa Fresca de Parte Aérea (g/planta)	Massa Seca de Parte Aérea (g/planta)
<i>Laranja</i>	3,55 a	1,5050 a	0,11 a	0,0198 a
<i>Azul</i>	2,4833 b	1,3733 a	0,10 a	0,0242 a
<i>Mesclada</i>	2,4000 b	1,3333 a	0,08 b	0,0192 a
DMS (5%):	0,4972	0,1528	0,6031	172,20
F (Genótipo)	8,8358**	2,3037 ^{NF}	5,7932**	2,9451 ^{NF}
F (Meio)	0,8969 ^{NF}	1,8722 ^{NF}	4,2877**	4,2974**
F (Interação)	2,4458**	0,7062 ^{NF}	0,5567**	0,8416 ^{NF}
Coeficiente de Variação (%)	84,129	85,534	26,973	26,620

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. ** = significativo a 1% de probabilidade; ^{NF}= não significativo a 5% de probabilidade.

O melhor desempenho do meio WPM no genótipo laranja pode estar relacionado a este se tratar de um meio com oferta reduzida de sais, inclusive nitrogênio, em relação ao meio MS (PALU et al. 2014). Segundo Pasqual (2001) apud Soares (2009), o meio WPM apresenta 25% das quantidades de íons nitrato e amônia proporcionalmente em relação ao meio MS. Ele foi originalmente formulado para culturas lenhosas (HARRY & THORPE, 1994; Melo et al., 1999) como o próprio nome do meio indica, Wood Plant Medium ou em tradução livre, meio para plantas lenhosas.

Já Bayanati et al. (2015) observou menor número de folhas em Rosa Hibryda, cv. “Black Baccarat” em meio WPM, em comparação com dois outros meios, VS (Van der Salm et al., 1994) e MS.

Em cultivo de Rosa canina (*Rosa canina* L.) em meio de cultura WPM, B5, e MS sem adição de reguladores também foi observado menor número de folhas por explante no meio WPM em comparação com B5 e MS (Toma et al. 2014).

Tabela 5. Análise de Variância para interação meio X genótipo em número de folhas.

Causas de Variação	GL	SQ	QM	F	P
Meio dentro de genótipo Azul	5	9,7907	1,9581	1,4776 ^{NS}	0,1999
Meio dentro de genótipo Laranja	5	21,285	4,2571	3,2124 ^{**}	0,0086
Meio dentro de genótipo Mesclada	5	7,2780	1,4556	1,0894 ^{NS}	0,3634
Resíduo	162	-	1,3252	-	-

** = Significativo a 1% de probabilidade. NS = Não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 6. Efeito simples dos meios dentro de genótipo Laranja.

Meio	Número de folhas
WPM	5,3 a
Quoirin & Lepoivre	3,8 ab
Gamborg B5	3,4 ab
MS modificado	3,2 ab
A4	3,1 ab
MS	2,5 b
DMS (5%):	1,485

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

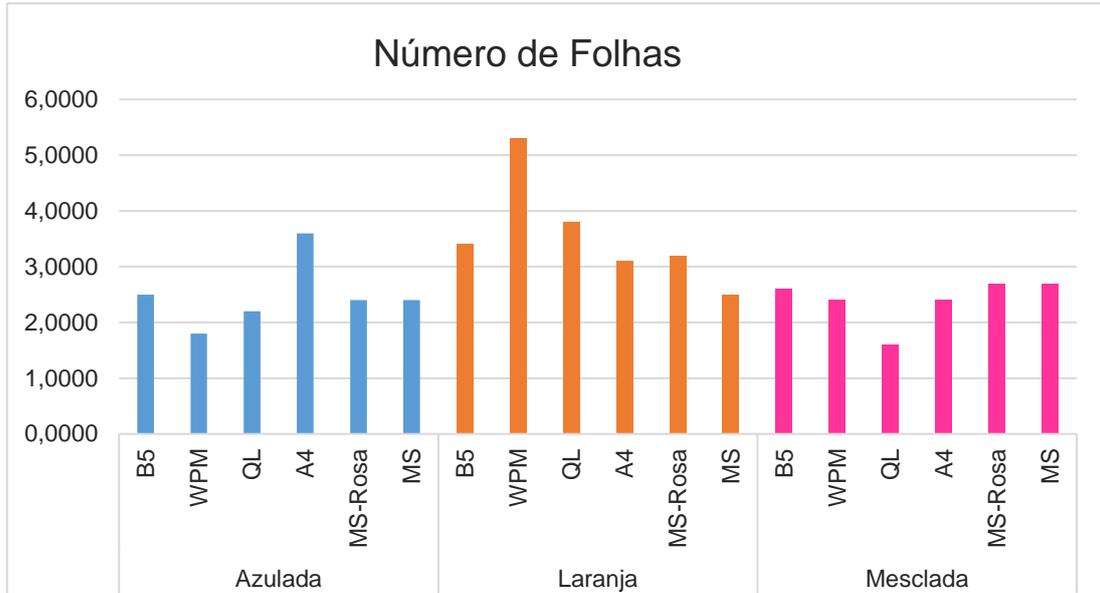


Figura 1- Gráfico do Número de folhas de cada genótipo em seis meios de cultura testados: Gamborg B5(B5), Wood Plant Medium (WPM), Quoirin & Lepoivre (QL), Murashige e Skoog modificado (MS-Rosa) e Murashige e Skoog (MS).

Portanto, os efeitos dos meios sobre o número de folhas por plântulas, ocorreram somente para o genótipo de roseira laranja.

5.1.2 Comprimento da maior brotação

Não foram observadas interações significativas entre o meio e o genótipo para comprimento da maior brotação (Tabela 4). O meio (Tabela 7), assim como o genótipo também não foram significativos a 5% pelo teste F para este parâmetro (Tabela 4).

Tabela 7. Teste de Tukey para comprimento da maior brotação.

Meio	Comprimento da maior brotação (cm)
A4	1,52 a
WPM	1,50 a
Gamborg B5	1,43 a
MS	1,41 a
Quoirin & Lepoivre	1,38 a
MS modificado	1,18 a
DMS (5%):	0,2634

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em trabalho similar com lenhosas, Chaves (2003) testou dois meios distintos, MS e WPM, e não observou alteração para tal parâmetro em ameixa cvs. Mr. S 1/8 e Okinawa. Radmann et al. (2009), observaram incremento no comprimento de brotações em meio QL, por volta de 51% em média para *Prunus persica*. De acordo com Leitzek et al. (2010), o meio MS foi capaz de promover maiores comprimentos de brotação em amoreira-preta e framboeseira

Em outro estudo, foi o meio WPM que promoveu brotações maiores em aceroleira (*Malpighia emarginata* DC.) in vitro, em detrimento do meio MS (Melo et al. 1999).

Em roseira cv. “Black Baccarat” foi observado maiores comprimentos de brotações em meio MS em comparação com WPM (Bayanati et al. 2015).

5.1.3 Massa fresca de parte aérea

O meio e o genótipo foram estatisticamente significativos a 1 % pelo teste F para Massa Fresca de Parte Aérea (Tabela 4). Os meios com médias significativas pelo teste Tukey a 5%, foram MS, A4 e MS modificado em relação aos meios WPM, Gamborg B5 e QL (Tabela 8). Esse resultado acompanha parcialmente a análise de massa fresca total, excluindo apenas o meio WPM das melhores médias. Mais uma vez é imprescindível analisar junto a outros fatores, tais como número de folhas, número de raízes, etc. Uma vez que o meio MS não tem influência no número de folhas, e não possui as melhores médias em parâmetros relacionados ao desenvolvimento de raízes, e a hiperhidricidade pode influenciar na média superior para massa fresca de parte aérea. Já em relação à variedade, os genótipos Azul e Laranja, que não diferiram entre si apresentaram médias superiores de massa fresca de parte aérea em relação ao genótipo mesclada (Tabela 4).

Tabela 8. Efeito dos meios sobre massa fresca de parte aérea.

Meio	Massa fresca de parte aérea (g/planta)
MS	0,13 a
A4	0,11 ab
MS modificado	0,09 ab
WPM	0,09 b
Gamborg B5	0,08 b
Quoirin & Lepoivre	0,08 b
DMS (5%):	1,04

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

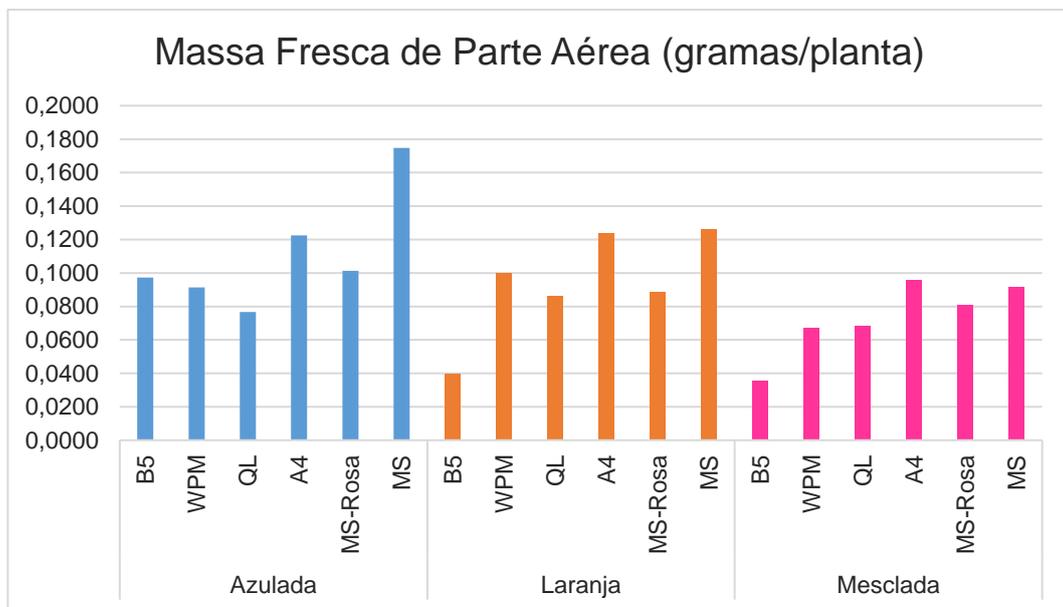


Figura 2 - Massa fresca de parte aérea dos genótipos nos meios de cultura Gamborg B5 (B5), Wood Plant Medium (WPM), Quoirin & Lepoivre (QL), Murashige e Skoog modificado (MS-Rosa) e Murashige e Skoog (MS).

5.1.4 Massa Seca de Parte Aérea

Apenas o meio foi significativo para o parâmetro em questão (Tabela 4). Os valores de média encontrados pelo teste de Tukey para massa seca de parte aérea, apontam que o meio A4 obteve média superior estatisticamente em relação aos meios B5 e WPM respectivamente, contudo não diferiu estatisticamente do meio MS, MS

modificado e QL (Tabela 9). Os meios MS, MS modificado, QL, que não diferiram entre si, junto ao meio B5, foram superiores ao meio WPM.

Tabela 9. Efeito dos meios sobre massa seca de parte aérea.

Meio	Massa seca de parte aérea (g/planta)
A4	0,03 a
MS	0,02 ab
MS modificado	0,02 abc
Quoirin & Lepoivre	0,02 abc
Gamborg B5	0,08 bc
WPM	0,02 c
DMS (5%):	296,93

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

5.2 Efeitos do genótipo e meio de cultura sobre o desenvolvimento de raízes de roseiras cultivadas in vitro

Tabela 10. Efeitos do genótipo, meio e interação sobre raízes das plântulas.

Genótipo	Número de raízes por planta	Comprimento da maior raiz (cm)	Massa Fresca de raiz (g/planta)***	Massa Seca de raiz (g/planta)***
Laranja	2,30 a	1,7075 a	0,006845 a	0,0008385 a
Azul	1,09 b	1,7051 a	0,00600 a	0,0006115ab
Mesclada	0,53 b	0,9900 b	0,002466 b	0,0002475 b
DMS (5%):	0,7207	0,6354	0,0075	0,0054
F (Genótipo)	21,966**	7,7479**	5,7027 **	7,0775**
F (Meio)	4,0705**	6,2236**	4,6470 ^{NS}	5,1222**
F (Interação)	2,4124*	1,9364*	1,9334**	8,0320**
Coefficiente de Variação (%)	160,18	546,91	147,61	189,41

Médias seguidas pela mesma letra nas 2ª e 3ª colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

= significativo a 1% de probabilidade. * = significativo a 5% de probabilidade. *= Teste de Games-Howell.

Médias seguidas pela mesma letra nas 3ª e 4ª colunas não diferem entre si pelo teste de Games-Howell a 5% de probabilidade.

Para número de raízes houve interação significativa do meio e do genótipo a 5% de probabilidade pelo teste F. O meio teve efeito significativo a 1% de probabilidade, assim como o genótipo (Tabela 10). Para genótipo, a rosa laranja foi superior aos genótipos azul e mesclada, que não diferiram entre si (Tabela 10). De acordo com Cunha et al. (2009), o processo de enraizamento em lenhosas, é genótipo-dependente.

Pelo teste de Tukey, o meio de cultura A4 obteve melhor desempenho para número de raízes que os meios MS modificado, Gamborg B5, e MS (que não diferiram entre si), contudo não diferiu significativamente dos meios WPM e Quoirin Lepoivre (Tabela 11).

Tabela 11. Efeito dos meios no desenvolvimento in vitro de raízes de roseiras.

Meio	Número de raízes
A4	2,31 a
WPM	1,60 ab
Quoirin & Lepoivre	1,38 ab
MS modificado	0,97 b
MS	0,80 b
Gamborg B5	0,79 b
DSM (5%):	1,2427

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

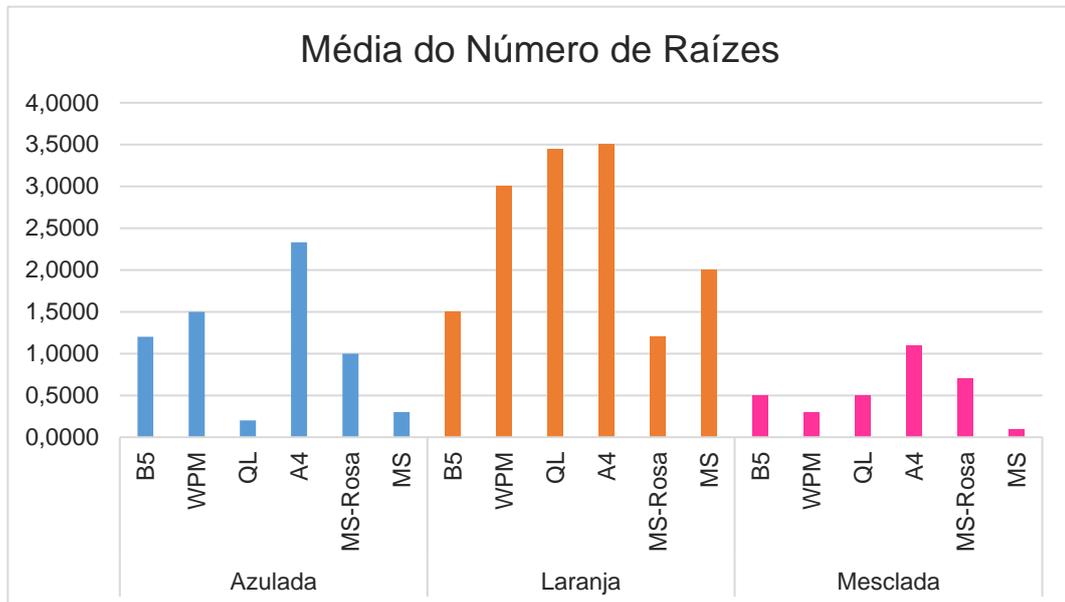


Figura 3 - Número de raízes dos genótipos em cada meio de cultura: Gamborg B5 (B5), Wood Plant Medium (WPM), Quoirin & Lepoivre (QL), Murashige e Skoog modificado (MS-Rosa) e Murashige e Skoog (MS).

Estes por sua vez, que apresentaram médias mais altas possuem em comum, o fato de sua formulação conter nitrato de cálcio, que os outros meios não apresentam, em comparação com outros nutrientes que também estão presentes nos meios com pior desempenho.

O processo de enraizamento está relacionado com a nutrição mineral (Malavasi, 1994), tendo o nutriente assim como a espécie comportamento muito variável no enraizamento adventício, e embora muito clara a relação do processo com a nutrição mineral, as inúmeras variáveis desse processo ainda não estão esclarecidas (Cunha, 2009). No processo de enraizamento, é fundamental concentrações relativamente elevadas de cálcio (Tripathi, 1971).

O cálcio é um elemento diretamente ligado ao enraizamento, por fazer parte da constituição da lamela média da célula vegetal, atuando nos processos de divisão e alongamento celular, assim sendo não é suficiente apenas fornecer o nitrogênio aos tecidos, mas associá-lo a uma fonte de cálcio. É também um mensageiro secundário na ação de auxinas (Geiss et al. 2009).

Além disso, o enraizamento, em meios sem a adição de auxinas, como no presente trabalho, tem no crescimento da parte aérea uma boa fonte de auxina,

translocada no sentido basipeto, promovendo o desenvolvimento de raízes (Grattapaglia et al, 1987; Bouil-lenne,1964 apud Aloufa, 2007).

O meio A4, unicamente, leva em sua composição fosfato monoamônio, que também pode ter relação com a média mais alta.

As quantidades totais de nitrogênio fornecidas pelos meios A4 e Gamborg B5 são relativamente próximos, 337,86 mg. L⁻¹ e 374,7 mg. L⁻¹ respectivamente, embora a formulação fornecedora de nitrogênio seja distinta. O meio A4 contém nitrato de potássio, nitrato de cálcio e fosfato de monoamônio, enquanto que o meio Gamborg B5 possui apenas nitrato de potássio e sulfato de amônio. Além de parte dos componentes serem distintos, a quantidade total de cálcio – medido como CaO - dos meios também difere, sendo muito menor no meio Gamborg B5 em relação ao meio A4, 57,2 mg. L⁻¹ e 167, 7mg.L⁻¹ respectivamente.

Em trabalho com cultura in vitro de *Rosa canina* não foram observadas raízes em meio MS, B5 e WPM cultivadas por seis semanas (Toma et al. 2014).

Em relação a interação, apenas dentro do genótipo mesclada nenhum dos meios foi significativo a 5% (Tabela 12). Dentro do genótipo azul, o meio A4 teve média mais alta que os meios MS e Quoirin e Lepoivre (tabela 13). Isso reforça a hipótese da fonte de fosfato monoamônio como facilitador do processo de enraizamento. Já dentro do genótipo laranja, os meios A4, Quoirin e Lepoivre e WPM foram superiores ao meio B5 (Tabela 14).

Tabela 12. ANOVA para Efeitos Simples dos meios para o parâmetro biométrico número de raízes.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	P
Meio dentro de genótipo azul	5	45,926	9,1852	4,0705**	0,0017
Meio dentro de genótipo laranja	5	46,351	9,2702	4,1082**	0,0016
Meio dentro de genótipo mesclada	5	18,021	3,6042	1,5972 ^{NS}	0,1639
Resíduo	157	-	2,2565	-	-

**= significativo a 1% de probabilidade. ^{NS}= não significativo a 5% de probabilidade

Tabela 13. Efeito simples dos meios no genótipo Azul para o parâmetro biométrico número de raízes.

Meio	Número de raízes
A4	2,10 a
WPM	1,50 ab
Gamborg B5	1,20 ab
MS modificado	1,00 ab
MS	0,30 b
Quoirin & Lepoivre	0,20 b
DMS (5%):	2,1524

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Tabela 14. Efeito simples de meio no genótipo Laranja para o parâmetro biométrico número de raízes.

Meio	Número de raízes
A4	3,50 a
Quoirin & Lepoivre	3,44 a
WPM	3,00 a
MS	2,00 ab
MS modificado	1,20 ab
Gamborg B5	0,67 b
DMS (5%):	2,1524

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

5.2.1 Comprimento da Maior Raiz

Os meios de cultura foram significativos a 1% pelo teste F, assim como o genótipo. Também houve interação significativa entre meio e genótipo a 5% pelo teste F (Tabela 10).

Em termos de alongamento celular, o cultivo sem a adição de auxinas é benéfico, porém em alguns casos sua ação pode ser inibitória para tal (Mitsuhashi-Kato et al., 1978.)

Os meios A4 e WPM foram superiores estatisticamente aos demais, contudo não diferiram entre si (Tabela 15). São os meios que oferecem as menores quantidades de nitrogênio (A4, 0,337 gramas de N e WPM, 0,195 gramas de N aproximadamente) entre todos os meios, sendo que o meio A4 difere pouco do meio

B5 em relação ao nitrogênio, pois as quantidades totais são muito próximas, 0,337 e 0,374 gramas.

De acordo com Caldas et al. (1998) o nitrato é a melhor forma de nitrogênio para roseiras, entre outras culturas, tais como cenoura, tendo efeito sobre o crescimento e desenvolvimento do vegetal in vitro, ao contrário de culturas como o arroz, cujo tecido de calos não assimila bem o nitrato em condição de cultivo in vitro.

Tabela 15. Efeito dos meios sobre comprimento da maior raiz.

Meio	Comprimento da maior raiz (cm)
A4	2,94 a
WPM	2,04 ab
Quoirin & Lepoivre	1,18 b
MS	1,09 b
Gamborg B5	0,99 b
MS modificado	0,56 b
DMS (5%):	1,0979

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

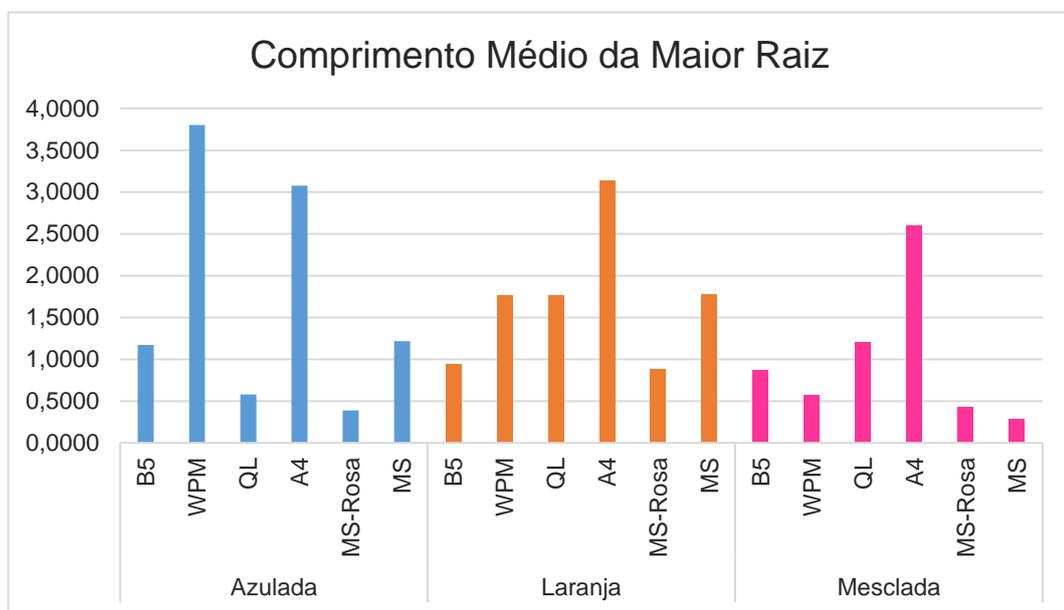


Figura 4 – Comprimento da Maior Raiz para cada genótipo nos meios Gamborg B5 (B5), Wood Plant Medium (WPM), Quoirin & Lepoivre (QL), Murashige e Skoog modificado (MS-Rosa) e Murashige e Skoog (MS).

Nesse sentido há a possível interpretação de que o fosfato monoamônio está relacionado, juntamente com a suplementação de cálcio (nitrato de cálcio), ao

processo de enraizamento. Houve interação meio x genótipo significativa pelo teste F a 5%, sendo observado efeito simples do meio para os genótipos Azul e Mesclada (Tabelas 10, 16 e 17).

Maurya et al. (2013) observaram maior número de raízes primárias e maiores médias de comprimentos de raízes em meio MS1/2 em comparação com MS (ambos suplementados com 0,5 mg. L⁻¹ de IBA) para Rosa Hybrida L. cv. “Benjamin Paul”, ou seja, o meio mais restritivo em nutrição vegetal promoveu resultados melhores.

Em um comparativo de meio WPM e MS para cultivo in vitro de Myrobalan 29C, um porta enxerto para ameixa e damasco, sem adição de reguladores, o meio MS se mostrou mais eficaz na promoção de maior número de raízes e maior comprimento de raiz, assim como na porcentagem de enraizamento (Shabani et al. 2014).

Tabela 16. Efeito simples dos meios sobre comprimento da maior raiz dentro do genótipo azul.

Meio	Comprimento da maior raiz (cm)
WPM	3,80 a
A4	3,07 ab
MS	1,22 bc
Gamborg B5	1,17 bc
Quoirin & Lepoivre	0,58 c
MS modificado	0,39 c
DMS (5%):	1,8960

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Tabela 17. Efeito simples dos meios sobre comprimento da maior raiz dentro do genótipo mesclada.

Meio	Comprimento da maior raiz (cm)
A4	2,60 a
Quoirin & Lepoivre	1,20 ab
Gamborg B5	0,86 ab
WPM	0,57 ab
MS modificado	0,42 ab
MS	0,28 b
DMS (5%):	1,8462

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quanto a porcentagem de plantas enraizadas, seguindo a ordem de genótipos azul, laranja e mesclada, foram obtidos valores de 50%, 50% e 40% dentro do meio B5; 60%, 100% e 20% no meio WPM, 20%, 90% e 50% dentro do meio QL; 80%, 80% e 60% para o meio A4 e 30% e 70% para genótipos azul e laranja nos meios MSR e MS, diferindo apenas o genótipo mesclada que obteve 40% de enraizamento no meio MSR e 10% no meio MS. Esse parâmetro, contudo, não deve ser separado da análise do número de raízes e do comprimento delas, uma vez que parte das plantas se apresentavam em um processo inicial de desenvolvimento radicular.

5.2.2 Massa fresca da raiz

Os dados referentes à massa fresca da raiz, da mesma forma que de massa seca da raiz, precisaram ser trabalhados também no software R Studio, e foram submetidos à transformação de postos, de forma a ser ranqueados e possibilitar a análise gerando uma anova e associando-a ao teste de Games-Howell na sequência.

O meio e o genótipo não foram significativos a 5 % pelo teste F, já a interação meio X genótipo foi significativa a 5% de probabilidade (Tabela 10). Desdobrando a interação a nível de genótipo, apenas a o genótipo azul apresentou resultados significativos nos valores de massa fresca da raiz ligados ao meio de cultivo (Tabela 18). Pelo teste de Games-Howell, dentro de genótipo azul, o meio WPM promoveu aumento de massa fresca da raiz em relação aos meios MS, MS modificado e Quoirin & Lepoivre, contudo não diferiu significativamente dos meios A4 e Gamborg B5 (Tabela 19). Os meios A4, B5, MS e MS modificado não diferiram entre si, contudo A4 apresentou média estatisticamente significativa superior ao meio QL, que apesar de apresentar a menor média entre os meios, não diferiu estatisticamente dos meios B5, MS, MS modificado e Quoirin & Lepoivre (Tabela 19).

Considerando os valores de média em si, meios mais restritivos em nitrogênio se mostram mais promissores no aumento da massa fresca da raiz. Murashige (1979) reforça que a redução das concentrações de sais no meio promove melhorias no processo de enraizamento.

Tabela 18. ANOVA para efeitos simples dos meios sobre massa fresca da raiz.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	P
Genótipo	2	0.00065	0.00032	5.7027	0.004
Meio dentro de Genótipo azul	5	0.00139	0.00028	4.9119**	3e-04
Meio dentro de Genótipo laranja	5	0.00064	0.00013	2.2581 ^{NF}	0.0511
Meio dentro de Genótipo mesclada	5	0.00038	0.00008	1.3437 ^{NF}	0.2485
Resíduo	162	0.00920	0.00006	-	-
Total	179	0.01226	0.00007	-	-

**= significativo a 1% de probabilidade. ^{NS}= não significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 19. Efeito simples dos meios sobre massa fresca da raiz dentro de genótipo azul.

Meio	Massa fresca da raiz (g/planta)
WPM	0.01345 a
A4	0.01066 ab
Gamborg B5	0.00702 abc
MS	0.003 bc
MS modificado	0.00158 bc
Quoirin & Lepoivre	0.00029 c
DMS (5%):	0,00766

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Games-Howell a 1% de probabilidade.

5.2.3 Massa seca da raiz

Os dados de Massa seca da raiz também apresentavam indícios de falta de homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene a 5% de probabilidade, assim como indícios de falta de normalidade de resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk a 5%. Dessa forma a melhor forma de analisá-los foi por meio da transformação de postos no software R Studio, onde puderam ser ranqueados e então a partir dos dados ranqueados feita a análise de variâncias. Para o parâmetro biométrico massa seca da

raiz, o genótipo e o meio foram significativos a 5% de probabilidade de acordo com o teste de Games-Howell, contudo a interação não foi significativa (Tabela 10).

Tabela 20. Efeito dos meios sobre massa seca da raiz em cada meio pelo teste de Games-Howell.

Meio	Massa seca da raiz (g/planta)
A4	0.001046667 a
WPM	0.001006667 a
Quoirin & Lepoivre	0.0005633333 ab
Gamborg B5	0.0003116667 b
MS	0.0003033333 b
MS modificado	0.0001633333 b
DMS (5%):	0,0025

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Games-Howell a 5% de probabilidade.

Os meios A4 e WPM, meios com as menores quantidades totais de nitrogênio, promoveram médias mais altas para massa seca da raiz (Tabela 20). O meio de cultura A4 e Gamborg B5 fornecem quantidades próximas de nitrogênio, 337,86 mg. L⁻¹ e 374,7 mg. L⁻¹ respectivamente, contudo o meio A4 obteve melhores resultados para o presente parâmetro. O fornecimento de nitrogênio do meio A4 é feito por meio de três compostos nitrogenados, nitrato de potássio, nitrato de cálcio e fosfato de monoamônio, já o fornecimento de nitrogênio do meio B5 fica por conta do nitrato de potássio e sulfato de amônio. Quando se avalia a relação nitrato/amônio dos meios encontra-se os seguintes valores: 42:1 (B5), 6:1 (WPM), 5:1 (MS), 19:1 (QL), 13:1 (A4), e 6:1 (MSR). A partir destes dados pode-se notar alguns pontos importantes, como a importância da qualidade da nutrição e o efeito da diminuição da quantidade de nitrogênio na composição dos meios, uma vez que, por exemplo, o meio WPM, MS e MSR possuem relação nitrato/amônio próximas, contudo, resultados muito distintos na promoção de aspectos da morfogênese, sendo o meio WPM superior em relação aos meios MS e MSR no desenvolvimento de raízes.

Outro ponto interessante para análise de parâmetros relacionados a processo de enraizamento, como já citado anteriormente, é a quantidade total de cálcio (CaO) do meio. O meio A4 apresenta cerca de 167,7 mg.L, de CaO, a mesma quantidade que o meio MS. Os meios B5, QL, WPM, e MS modificado apresentam 57,2 mg. L⁻¹, 137,3 mg. L⁻¹, 36,63 mg. L⁻¹, 670,2 mg. L⁻¹, e 479,5 mg. L⁻¹ de cálcio total

respectivamente. Quando consideramos apenas o elemento propriamente dito, (Ca), temos que os meios B5, QI, MS, WPM, A4 e MS modificado apresentam 40,8 mg. L⁻¹, 98,25 mg. L⁻¹, 119,89 mg. L⁻¹, 106,15 mg. L⁻¹, 119,98 mg. L⁻¹, e 479,5 mg. L⁻¹ de cálcio total respectivamente.

De acordo com Arruda et al. (2000) existe uma associação entre substâncias reguladoras de crescimento e o cálcio, mais evidente em zonas de diferenciação. O cálcio é também um elemento componente da lamela media na célula vegetal e atua na divisão celular (ARRUDA et al. 2000), portanto fundamental para a formação de novas células e tecidos, contudo é pouco móvel dentro do vegetal, e por sua mobilidade se dar de forma passiva, a própria condição de uma planta in vitro, com taxa respiratória reduzida, acaba por evidenciar sintomas ou mesmo ausência de processos morfogênicos, tais como necroses apicais ou ausência de enraizamento respectivamente, que podem ser contornados com a suplementação do meio de cultura com mais cálcio (CARVALHO et al. 2009). Os genótipos azul e laranja também apresentaram médias melhores para massa seca da raiz, em detrimento do genótipo mesclada (Tabela 10).

Entre os fatores que influenciam o enraizamento in vitro de roseiras está o genótipo, os meios de cultura, quantidade de sacarose, presença ou não de carvão no meio, assim como de reguladores de crescimento e de sais inorgânicos no meio de cultura (PATI, 2006).

Hyndman et al. (1982) reduziram as concentrações de KNO₃ e NH₄NO₃ e puderam observar que as porcentagens de enraizamento melhoraram significativamente, assim como a quantidade de raízes por explante, enquanto que Wada et al. (2015) observaram que reduzindo a concentração de nitrogênio e aumentando a concentração de cálcio no meio de cultura podiam ser notados benefícios no desenvolvimento in vitro de algumas espécies.

De acordo com Mokotedi et al. (2000), a condição de cultivo in vitro também não altera o enraizamento adventício em Eucalipto (*Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus nitens*), que apresenta também enraizamento genótipo-dependente, evidenciando diferenças no processo entre híbridos e mesmo entre clones com a mesma origem.

A fonte de nitrogênio in vitro também tem relação com o balanço de hormônios. Em *Tillandsia pohliana*, uma planta da família Broeliaceae, o NH_4NO_3 promoveu maiores concentrações de citocinina e menores concentrações de ácido indol acético (AIA) em comparação com uma fonte orgânica de nitrogênio, assim como também foi relacionado com valores maiores de massa fresca e massa seca totais (Mercier e Kerbauy, 1998). Tal estudo demonstra como a forma de nitrogênio disponível para as plantas afeta o balanço de fito-hormônios dentro do vegetal, e em consequência disso o seu desenvolvimento.

As auxinas em geral estão relacionadas com o processo de enraizamento nas plantas, e o AIA tem ação concentrada no alongamento celular, através de dois mecanismos principais, 1) por meio de estímulos de síntese celular e 2) atuando contra a ação de enzimas relacionadas à microfibrilas, componentes da parede celular promovendo assim maior plasticidade da membrana celular, sendo o resultado disso a expansão de raízes e a formação de raízes adventícias no caule do vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2004). Portanto a fonte de nitrogênio pode estimular ou inibir o processo de enraizamento, entre outros aspectos de desenvolvimento vegetal.

5.3 Massa Fresca total

De acordo com a ANOVA para Massa Fresca Total o meio e o genótipo apresentaram efeito significativo a 1% pelo teste F (Tabela 21). Em relação à massa fresca das plantas, o meio MS obteve média superior estatisticamente significativa pelo teste de Tukey em relação aos meios Gamborg B5 e Quoirin e Lepoivre, contudo não diferiu dos meios A4, WPM, e MS modificado (Tabela 22).

Tabela 21. ANOVA para efeitos principais e interações em massa fresca total.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	P
Meio	5	38,720	7,7439	4,1442**	0,0014
Genótipo	2	25,780	12,890	6,8982**	0,0013
MeioXGenótipo	10	11,339	1,1339	0,6068 ^{NS}	0,8065
Resíduo	162	302,71	1,8686	-	-
Total	179	378,55	-	-	-

** = significativo a 1% de probabilidade. ^{NS} = não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 22. Efeito dos meios sobre massa fresca total.

Meio	Massa fresca total (g/planta)
MS	0,14 a
A4	0,12 ab
WPM	0,09 abc
MS modificado	0,09 abc
Gamborg B5	0,09 bc
Quoirin & Lepoivre	0,08 c
DMS (5%):	1,0180

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

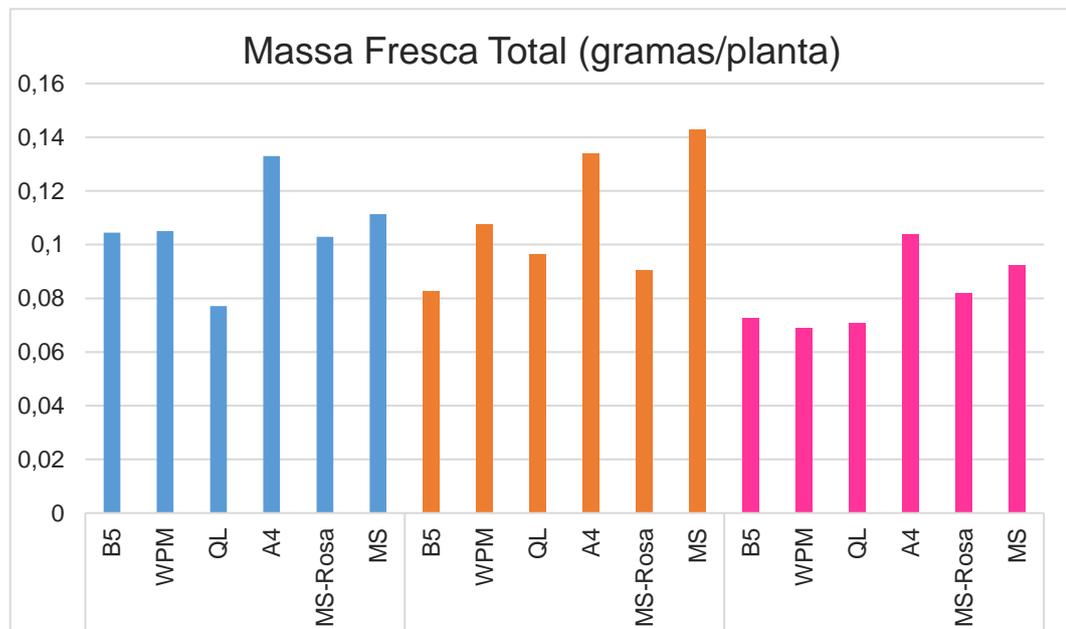


Figura 5 - Massa fresca total de três genótipos nos meios Gamborg B5 (B5), Wood Plant Medium (WPM), Quoirin & Lepoivre (QL), Murashige e Skoog modificado (MS-Rosa) e Murashige e Skoog (MS).

O meio MS não difere qualitativamente em suas fontes de nitrogênio do meio MS modificado, apenas na quantidade total de nitrogênio, que se apresenta igual a 0,8406 g no meio MS e 0,4203 g no meio MS modificado. Contudo difere em composição e mesmo em quantidades de N, dos meios A4 (meio com menor quantidade total de N), e WPM, o que dificulta a conclusão de que a quantidade total de N promova aumento de massa fresca. Além disso o meio MS é similar em composição de nitrogênio em relação ao meio QL, este apresentando a mais o nitrato

de cálcio. Contudo seu desempenho pelo teste de Tukey é o menos favorável para o parâmetro em questão.

Este parâmetro, contudo, pode não fornecer o real desenvolvimento das plantas, uma vez que no meio MS foram observados diversos sinais de necrose foliar, hiperhidricidade, baixo desenvolvimento radicular, e foi o meio com menor número de folhas.

Analisando somente o efeito do genótipo (Tabela 23) sobre a massa fresca temos que o genótipo laranja e azul apresentam valores superiores de massa fresca estatisticamente significantes em relação ao genótipo mesclada, mas não diferem entre si.

Tabela 23. Efeito do genótipo sobre massa fresca total.

Genótipo	Massa fresca total
Azul	0,17 a
Laranja	0,11 a
Mesclada	0,08 b
DMS (5%):	0,5904

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Não houve interação significativa entre meio e genótipo para massa fresca, sendo possível apenas notar um resultado significativo para efeito simples de meio, no genótipo Azul, meio de cultura MS com desempenho superior (Tabela 24).

Tabela 24. Efeito simples dos meios sobre massa fresca total dentro de genótipo azul.

Meio	Massa fresca total (g/planta)
MS	0,18 a
A4	0,13 ab
WPM	0,10 ab
Gamborg B5	0,10 ab
MS modificado	0,10 ab
Quoirin & Lepoivre	0,08 b
DMS (5%):	1,7632

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para efeito de uma melhor análise tal parâmetro deve ser visto em conjunto com massa seca total.

5.4 Massa seca total

O meio e o genótipo tiveram efeito significativo para massa seca total a 1% e 5% respectivamente, enquanto que a interação meio x genótipo não foi significativa (tabela 25). Os meios com média superior estatisticamente significativas foram os meios A4, MS e MS modificado em relação aos meios QL, B5 e WPM (Tabela 26). Entre o primeiro grupo não houve diferença significativa, assim como dentro do segundo, juntamente com os meios MS e MS modificado também não houve. Entre os meios MS e MS modificado não há diferença entre as fontes de nitrogênio, apenas na quantidade, que no meio MS modificado corresponde à metade do nitrogênio presente no meio MS. Já o meio A4 composto por nitrato de potássio, nitrato de cálcio e fosfato monoamônio, também promoveu aumento da massa seca. Os valores de massa seca acompanham os resultados para massa fresca, o que de fato indica que os meios interferem no aumento da massa das plantas.

Tabela 25. ANOVA para efeitos e interações sobre massa seca total.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F	P
Meio	5	3321365	664273	4,2152**	0,0013
Genótipo	2	10515111	525756	3,3362*	0,0380
MeioXGenótipo	10	1132621	113262	0,7187 ^{NS}	0,7060
Resíduo	162	25529625	157590	-	-
Total	179	31035122	-	-	-

*= significativo a 1% de probabilidade. *=significativo a 5% de probabilidade. ^{NS}= não-significativo a 5% de probabilidade.

Tabela 26. Efeito dos meios sobre massa seca total.

Meio	Massa seca total (g/planta)
A4	0,028 a
MS	0,03 ab
MS modificado	0,02 ab
Quoirin & Lepoivre	0,02 b
Gamborg B5	0,09 b
WPM	0,02 b
DMS (5%):	295,62

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Quanto ao efeito dos genótipos sobre o parâmetro em questão, os genótipos azul e laranja se mostraram superiores em relação ao genótipo mesclada, mas não houve diferença significativa entre elas (Tabela 27).

Tabela 27. Efeito do genótipo sobre massa seca total.

Genótipo	Massa seca total (g/planta)
Azul	0,02 a
Laranja	0,02 ab
Mesclada	0,02 b
DMS (5%):	171,44

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Games-Howell a 5% de probabilidade.

6. CONCLUSÃO

Para alguns autores as Roseiras podem ser propagadas por diferentes técnicas, entre elas as técnicas de germinação de sementes, embora, alguns dos seus atributos sejam a alta variabilidade fenotípica das plantas originárias desse sistema de propagação, em especial pela alta heterozigosidade associada aos seus genótipos. Como alternativa técnicas de propagação vegetativa, como estaquia e enxertia cumprem atualmente muito bem a demanda dos mercados por plantas geneticamente idênticas (MARREIROS, 2010; FOLHAS et al., 2011).

A procura do consumidor por produtos de qualidade tem aumentado, por esse motivo, nota-se a exigência de consumidores por produtos de qualidade e com maior valor agregado. Esses fatores têm obrigado o setor a repensar suas cadeias produtivas, a fim de atender às exigências do consumidor e produzir com sustentabilidade.

Nesse sentido estudos com roseiras envolvendo a cultura de tecidos tem aumentado no mundo, e compreender as relações de balanço nutricional e hormonal e de desenvolvimento vegetal podem facilitar ainda mais o processo produtivo.

O experimento feito buscou analisar o processo de cultivo de roseiras in vitro com atenção voltada para nutrição vegetal, enfatizando diferenças nos processos de morfogênese e desenvolvimento vegetal.

Através do presente trabalho foi possível concluir que: o enraizamento em roseiras é um processo genótipo-dependente; a fonte de sais para o meio de cultura, e suas quantidades tem influência sobre a morfogênese e o desenvolvimento vegetal in vitro sendo favorável compreender quais sais estão mais relacionados com desenvolvimento de parte aérea ou raízes para estabelecimento de protocolos produtivos; meios mais e menos restritivos em nitrogênio total promovem respostas distintas, tanto nos processos de enraizamento quanto ao desenvolvimento de parte aérea; a suplementação com cálcio está relacionada a melhora no processo de enraizamento.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLMOHAMMADI, M. et al. Germinação de embriões in vitro e hibridização interploidia de rosa (*Rosa* sp). **Euphytica**, v. 198, n. 2, pág. 255-264, 2014.
- Ageningen, v.227, p.187-196, 1988.
- AIPH International statistics flowers and plants. V.64 International Association of Horticultural Producers 2016.
- AIPH.International statistics flowers and plants. V. 63 International Association of Horticultural Producers 2015.
- ALI M. A. et al. Effect of phytohormones and their diverse concentrations on regeneration of rose (*rosa hybrida* l.) Department of Biotechnology, Faculty of Crop Production, Sindh Agriculture University, Tandojam, Pakistan 2020.
- ALP, S.A. & ARSLAN, N. The effect of gibberellic acid on germination of rosehip seeds (*Rosa canina* L.). Proceedings of 1st International Symposium on Woody Ornamentals of the Temperate Zone, Průhonice, Czech Republic 2008.
- AMBROS, E.; VASILYEVA, O.; NOVIKOVA, T. Effects of in vitro propagation on ontogeny of *Rosa canina* L. micropropagated plants as a promising rootstock for ornamental roses. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**. V.17. p.72-78, 2016.
- BARBIERI, R.L.; STUMPF, E. R.T. Origem, evolução e história das rosas cultivadas, **R. bras. Agrociência**, Pelotas, v.11, n. 3, p. 267-271, 2005.
- BAYANATI, Mina & Davoodi, Daryoush & Kermani, Maryam. (2015). Effect of Agar and Different Culture Media on the Micropropagation of *Rosa hybrida* cv.'Black Baccara'. 5. 75-81.
- BERKI, D. & MENRAD, K. Consumer Preferences of Sustainability Labeled Cut Roses in Germany. **Sustainability**. 2019.
- BERKI-KISS D. Fairtrade or conventional roses – Influencing factors for sustainability conscious consumer choice. University of Applied Sciences Weihenstephan-Triesdorf, Germany 2020
- BO J.; HUIRU D.; XIAOHAN Y. Shortening hybridization breeding cycle of rose-a study on mechanisms controlling achene dormancy. **Acta Horticulturae** v. 404: p. 40–47, 1995.
- BOSCO R. et al. Dynamics of abscisic acid and indole-3-acetic acid during the early-middle stage of seed development in *Rosa* x *hybrida* **Plant Growth Regulation**, 2015.
- BUCHMAAN S.** The Reason for Flowers: **Their History, Culture, Biology, and How They Change Our Lives, 2016.**
- BURRELL et al. Genetic variation in somatic embryogenesis of rose. **HortScience** v. 41, p. 1165–1168, 2006.
- CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Ed.). Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas. Brasília: Embrapa/CNPH, 1998. p. 87-132.
- CARELLI, B.P.; ECHEVERRIGARAY S. An improved system for the in vitro propagation of rose cultivars. 2001.
- CHAUHAN U. Some natural extracts from plants as low-cost alternatives for synthetic PGRs in rose micropropagation. Department of Biotechnology, Shree M & N Virani Science College, Rajkot (India) 2018.
- CHAVES, A.C. Micropropagação de portaenxertos para fruteiras de caroço. 59f.Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, 2003.
- CHENG, F.S.; ROOSE, M. L. Origem e herança do nanismo pelo porta-enxerto cítrico *Poncirus trifoliata* Flying dragon'. **Journal of the American Society for Horticultural Science** , v. 120, n. 2, pág. 286-291, 1995.
- COUVILLON, G.A. Rooting responses to different treatments. **Acta Horticulturae**,
- CUNHA, Ana Catarina Monteiro Carvalho Mori da et al. Relação do estado nutricional de minicepas com o enraizamento de miniestacas de eucalipto. Revista Brasileira de Ciência do Solo [online]. 2009, v. 33, n. 3 , pp. 591-599.

DEBERGH P., DE RIEK J., MATTHYS D. Nutrient supply and growth of plants in culture. In: Lumsden P.J., Nicholas J.R., Davies W.J. (eds) Physiology, Growth and Development of Plants in Culture. Springer, Dordrecht 1994.

DREFAHL A. Organogênese de Rosa x hybrida CV. VEGAS. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-graduação em Agronomia, 2004.

EPSTEIN E., CHEN K-H., COHEN J. Identification of indole- 3-butyric acid as an endogenous constituent of maize kernels and leaves. **Plant growth regul** v. 8: p.215-223. 1989.

EUROSTAT. European Statistics. European Commission. 2021.

FAREI. Food and Agricultural Research and Extension Institute. 2018.

FIOR C. Propagação de Planats in vitro: da teoria à pratica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.

FLOWER INDUSTRY IN THE NETHERLANDS (2020). Statista.2020.

FLOWER Industry Statistics. About Flower Industry Statistics. 2017.

FOWLER, J. A. P.; BIANCHETTI, A. Dormência em sementes florestais. **Embrapa Florestas-Documentos** (INFOTECA-E), 2000.

FRANKS, S. J.; SIM, S.; WEIS, A. E. Evolução rápida do tempo de floração de uma planta anual em resposta a uma flutuação climática. **Anais da Academia Nacional de Ciências**, v. 104, n. 4, pág. 1278-1282, 2007.

FRANZON, R. C. et al. **Produção de mudas**: principais técnicas utilizadas na propagação de fruteiras. Planaltina, DF: Embrapa, 2010.

Galeriani, Tatiani & Cosmo, Bruno & Ceccon, Ana & Marchi, Caroline & Mundt, Tamara. (2020). Cultivo de rosas de corte. Revista Agronomia Brasileira. 4. 10.29372/rab202003.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R.A; OJIMA, K. Exigências nutricionais de culturas em suspensão de células radiculares de soja. **Pesquisa celular experimental**, v. 50, n. 1, pág. 151-158, 1968.

GEISS, G. et al. Adventitious root formation: new insights and perspectives. In: Beekman, T. (Ed.) Annual plant reviews: root development. New York: John Wiley & Sons, 2009. V. 37. P. 127-156.

GHAZIJAHANI E. H. et al. Foliar application of citric and malic acid to stock plants of rose alters the rooting of stem cuttings **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, 2018.

GIRI, C.C., SHYAMKUMAR, B. & ANJANEYULU, C. Progress in tissue culture, genetic transformation and applications of biotechnology to trees: an overview. Trees v.18, p.115–135 2004.

GLIMN-LACY J; KAUFMAN P.B. Botany Illustrated: Introduction to Plants, Major Groups, Flowering Plant Families, 2006.

GODOY, S. et al. Temporary immersion systems for the mass propagation of sweet cherry cultivars and cherry rootstocks: development of a micropropagation procedure and effect of culture conditions on plant quality. **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant** v.53, p.494–504, 2017.

GOLINO, D.A., SIM, S.T., LEE, J.A. AND ROWHANI, A. Elimination of rose mosaic viruses using microshoot tip tissue culture. **Acta Hortic.** 751, 237-239, 2007.

GOLINO, DA et al. Eliminação de vírus do mosaico de rosas usando cultura de tecidos de ponta de microbrotos. In: **IV Simpósio Internacional de Pesquisa e Cultivo de Rosas**. pág. 237-239, 2005.

GOLOŠIN, B.; RADOJEVIC, L. Micropropagação de porta-enxertos de macieira. In: **Simpósio sobre Problemas In Vitro Relacionados à Propagação em Massa de Plantas Hortícolas** v.212 p. 589-594, 1985.

GRATTAPAGLIA, D. et al. Efeito residual de BAP e NAA na multiplicação e enraizamento in vitro de Eucalyptus. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 2., 1987, Brasília, DF. Resumos ... Brasília, 1987. p.10.

GRYGORCZYK, A., S. et al. The most valuable player may not be on the winning team: Uncovering consumer tolerance for color shades in roses. **Food Qual. Prefer.** V.47: p.23–28, 2014.

GUDIN, S. et al. Influence of endocarp thickness on rose achene germination: genetic and environmental factors. **HortScience** v.25 n.7, p.786–788, 1990.

HAO, Y. et al. Engineered nanomaterials inhibit *Podosphaera pannosa* infection on rose leaves by regulating phytohormones. **Environmental Research.** v.170, p 1-6, 2019.

HAOUALA F. et al. Enhancing Seed Germination in Rose (*Rosa rubiginosa* L.). **Med Aromat Plants** v.2 p.139. 2013.

HARRY, I. S.; THORPE, T. A. Regeneration of plantlets through organogenesis from mature embryos of jack pine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v.37, n.2, p.159-164, 1994.

HIRATA H. et al. Biosynthesis of floral scent 2-phenylethanol in rose flowers, **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.80, n.10, p.1865-1873, 2016.

HUMMER, K. E.; JANICK, J. Rosaceae: taxonomy, economic importance, genomics. In: FOLTA, K. M.; GARDINER, S. E. (Org.) **Genetics and genomics of Rosaceae**. New York: Springer, p. 1-17, 2009.

HYNDMAN S.E, Hasegawa P.M, Bressan R.A. Stimulation of root initiation from cultured rose shoots through the use of reduced concentrations of mineral salts. *Hortic Sci* 1982.

IBRAFLOR. Instituto Brasileiro de Floricultura. 2021.

IWATA H. et al. The TFL1 homologue KSN is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry. **PlantJ.** v..69, p.116–125, 2012.

KÄMPF, N. A. et al. **Floriculture: techniques of preparation of substrates**. Brasília: LK Publishing and Communication, 132p, 2006.

KATSUMOTO, Yukihisa et al. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. **Plant and Cell Physiology**, v. 48, n. 11, p. 1589-1600, 2007.

KHAN M.A. et al. Effect of various hormones and diferente rootstocks on rose propagation, 2004.

KHOSH-KHUI M.; JABBARZADEH Z. Factors affecting tissue culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.), 2005.

KORASICK, D. A.; ENDERS, T. A.; STRADER, L. C. Biossíntese de auxina e formas de armazenamento. **Revista de botânica experimental**, v. 64, n. 9, p. 2541-2555, 2013.

KROIN J. **Propagation of roses: Stenting- Simultaneously Cutting and Grafting** President Hortus, USA, 2016.

LE BRIS et al. **Basipetal Gradient of Axillary Bud Inhibition Along a Rose (Rosa hybrida L.) Stem: Growth Potential of Primary Buds and their Two Most Basal Secondary Buds as Affected by Position and Age**, 1998.

LEE S. Y. et al. Expression of SOD2 enhances tolerance to drought stress in roses, 2007.

- LEITZKE, L. N., et al., Influência do meio de cultura, tipo e concentração de citocininas na multiplicação in vitro de amoreira-preta e framboeseira. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 352-360, 2010.
- LEMPER, J., 1976. Marketing of flowers. *Deutscher Gartenbau*, v.63, p. 890-897.
- LEUS L. et al. Rose. In: Van Huylbroeck J. (eds) **Ornamental Crops**. Handbook of Plant Breeding, vol 11. Springer, 2018.
- LINSMAIER, E. M., & SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.18, p.100–127, 1965.
- LINSMAIER, E. M., & SKOOG, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.18, p.100–127, 1965.
- LINSMAIER, E. M., & Skoog, F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.18, p.100–127, 1969.
- LLOYD, G. B., & MCCOWN, B. H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagators' Society*, v.30, p.412–427, 1980.
- MALAVASI, U.C. Macropropagação vegetativa de coníferas - perspectivas biológicas e operacionais. *Flor. Amb.*, 1:131-135, 1994
- MARQUES D. A. Influência de fontes de nitrogênio sobre o desenvolvimento das gemas axilares de explantes caulinares de *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Cultivado in vitro. **Brazilian Journal of Botany**, v. 21, p. 141-147, 1998.
- MARREIROS, E. de O. Influência de substratos no enraizamento das estacas e na produtividade da roseira. 2010.
- MATLOOBI, M. et al. Effect of plant age and methods of stem treatment on the quality of cut roses.** *Journal of plant physiology and breeding*, v.8 n.1, p. 1-9, 2018.
- MATOS, A. V. C. da S et al. AgNO₃ melhorou a micropropagação e estimulou o florescimento in vitro de rosas (*Rosa x hybrida*) cv. Sena. **Horticultura Ornamental**, v. 27, p. 33-40, 2020.
- Maurya, Rajendra & Yadav, Ram & Godara, N & Beniwal, Vijay. (2013). IN VITRO PLANT REGENERATION OF ROSE (*Rosa hybrida* L.) CV. „BENJAMIN PAUL“ THROUGH VARIOUS EXPLANTS.
- MELO M. N. et al. Estabelecimento do cultivo in vitro da aceroleira (*Malpighia glabra* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 1, p. 102-107, 1999.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G. B. Endogenous IAA and cytokinin levels in bromeliad shoots as influenced by glutamine and ammonium nitrate treatments. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 10, n. 3, p. 225-228, 1998.
- MEYER S.E. **Rosa L.**: rose, briar. In: Bonner FT, Karrfalt RP (eds.) *The Woody Plant Seed Manual*, Agriculture Handbook n. 727, p. 974–980. Washington, DC: US Department of Agriculture, Forest Service, 2008.
- MITSUHASHI-KATO, M. et al. The nature of the dual effect of auxin on root formation in *Azukia* cuttings. **Plant Cell Physiol**, v. 19, p. 1535-1542, 1978.
- MOKOTEDI, M.E.O.; WATT, M.P.; PAMMENTER, N.W. & BLAKEWAY, F.C. In vitro rooting and subsequent survival of two clones of cold-tolerant *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus nitens* Hybrid. *HortScience*, 35:1163-1165, 2000.
- MONDER J. et al. The Impact of Seasonal Changes in Plant Tissue on Rhizogenesis of Stem Cuttings of Once Blooming Roses. **Notulae Botanicae**, 2016.
- MUÑOZ, M. Caracterização de *Botrytis cinerea* de rosas de flores de corte comerciais e avaliação de práticas atuais de manejo de culturas. Tese de Doutorado. Universidade Clemson, 2018.

- MURASHIGE T. Principles of rapid propagation. In: Hughes KW, Hanks R, Constantin M, editors. Propagation of higher plants through tissue culture A bridge between research and application National Tech In to Serv, US Dept of commerce Spring field; p. 14 – 24. 1979.
- MURASHIGE, T., & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473–497, 1962.
- NACHEVA, L. e IVANOVA, V. Silver nitrate and chlorhexidine gluconate – effective surface sterilization agents in disinfection procedures at the initiation of woody shoot tip and embryo culture. **Journal of BioScience and Biotechnology**. v.6. p.187-190, 2019.
- NASRI A. et al., Large-scale propagation of Myrobalan (*Prunus cerasifera*) in RITA® bioreactors and ISSR-based assessment of genetic conformity, **Scientia Horticulturae**, v.245, p.144-153, 2019.
- NITSCH, J. P. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. **Phytomorphology**, v.19, p.389–404, 1969.
- NITSCH, J. P. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. **Phytomorphology**, v.19, p.389–404, 1965.
- NODA N. Recent advances in the research and development of blue flowers. **Breed Sci.** v.68, n.1 p.79-87, 2018.
- OECD. Cut Flowers. Observatory of Economic Complexity. 2021.
- OKITSU N. et al. Flower Color and Its Engineering by Genetic Modification. In: Van Huylenbroeck J. (eds) **Ornamental Crops**. Handbook of Plant Breeding, vol 11. Springer, 2018.
- ORLIKOWSKA T. et al. Tulip. In: Van Huylenbroeck J. (eds) **Ornamental Crops**. Handbook of Plant Breeding, vol 11. Springer, 2008.
- OTIENDE, M. et al. Effects of cutting position of rose rootstock cultivars on rooting and its relationship with mineral nutrient content and endogenous carbohydrates. **Scientia Horticulturae** v.225. p.204-212, 2017.
- PALÚ, E. G. et al. Meios nutritivos no estabelecimento in vitro de figueira. **Enciclopédia Biosfera**, v.10 n.19, 2014.
- PATI K. P. Micropropagation, protoplast culture and its implications in the improvement of scented rose. Ahuja Division of Biotechnology, Institute of Himalayan Bioresource Technology, India 2001.
- Pati, P. K., Rath, S. P., Sharma, M., Sood, A., & Ahuja, P. S. In vitro propagation of rose—a review. *Biotechnology Advances*, 24(1), 94–114, 2006.
- PHILLIPS C. G. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods** Oluf Gamborg, Pages 1-32 2015.
- PIZETTA, P.U.C. Porta-enxerto de Roseira (*Rosa* pp.): Produção de Rosas “Tineke” e “Versilia” e Resistência ao Nematóide *Meloidogyne hapla*, 2006.
- POURGHORBAN M. et al. Propagation of *Rosa hybrida* L. cv. Dolce Vita by stenting and stem cutting methods in response to different concentrations of IBA. - **Adv. Hort. Sci.**, v.33 n.1: p.105-111, 2019.
- R CORE TEAM (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- RADMANN E. B. et al. Multiplicação in vitro e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto ‘tsukuba 1’ (*Prunus persica* L.), 2009.
- REITZ, R. Flora Ilustrada Catarinense – Rosáceas. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. p.135, 1996.

REMAI, A. et al. A survey of flowering genes reveals the role of gibberellins in floral control in rose. **Theoretical and applied genetics**, 2009.

RITTER et al. Rooting of Tineke and Natal Briar rose stem cuttings in different substrates.1. 2018.

ROBERTS, A.V., SMITH, E.F. The preparation in vitro of chrysanthemum for transplantation to soil. **Plant Cell Tiss Organ Cult** v.21, p.129–132,1990.

ROUT G. R. et al. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. 2006.

ROYAL FLORA HOLLAND. Popular Roses (2016), 2022 Acesso em: 1º jan. 2022.

ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY. Damping off. The Royal Horticultural Society. 2020.

SARGENT, D.J. et al. The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. **Theor Appl Genet** v.114, p.373–384 2007.

SCHENK, A. V., & HILDEBRANDT, A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. **Canadian Journal of Botany**, v.50, p.199–204, 1972.

SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S.; GUEDES, R. S. Uso e aplicações biotecnológicas do cultivo in vitro de células, tecidos e órgãos de plantas. Embrapa Acre: Ciência e tecnologia para o desenvolvimento sustentável do Sudoeste da Amazônia. Rio Branco, Embrapa Acre, p. 221-246, 2009.

SIM, ST et al. Eliminação de vírus de rosa usando cultura de tecido de ponta de microbroto. In: **VII Simpósio Internacional de Pesquisa e Cultivo de Rosas 1232**. 2017. pág. 241-246.

SOARES, F.P. et al. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA3 e pH sobre a germinação in vitro de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**. v. 33, n. especial, 2009.

SOUZA-PIMENTEL, G. C. de. Biologia de *Phytoseiulus macropilis* (Banks, 1904) Acari: Phytoseiidae), controle biológico do ácaro-rajado em roseiras e seletividade de produtos fitossanitários a fitoseídeos. 100 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Entomologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SUNTORY. Stories of development. Disposable at sic/research/s_bluerose/story/, Acesso em: 07 abr. 2022. 2009.

SZMAGARA, M. et al. The effect of shoot bending and rootstock on quantity and quality of cut flower of rose cv. 'red house' yield. **Acta scientiarum Polonorum**. v.15. p.65-75, 2016.

TAWFIK, A. ET AL. 'Optimizing Micropropagation Protocol for Rosa hybrida cv. Eiffel Tower with Improved in vitro Rooting Ability', **Egyptian Journal of Horticulture**, v.45 n.2, p. 323-335, 2018.

THE PLANT LIST, Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (Acesso em 1º January), 2013.

THIMANN K. Auxins and the inhibition of plant growth. **Biological Reviews**, 2008.

THIMANN, K. Auxins and the inhibition of plant growth. **Biological Reviews**. v.14. p.314 - 337. 2008.

Toma S., Al-Mizory R., S. M., Faizy L., & S., (2014). Rooting Response of *Rosa canina* and *Cotoneaster acuminatus* to Different in vitro Factors. *Journal of Experimental Agriculture International*, 4(6), 724-731
TRIPATHI, B. K. Études sur la nutrition minérale et la néoformation de racines par lês tissues de topinambour cultivés in vitro. Lês cultures de tissus de plantes, (Ed) Centre

Nat Rech Sei) Paris, p. 201-208, 1971. VARVERI C. et al. **Principles for Supplying Virus-Tested Material**, 2015.

VIANA A. M.; MAZZA M. C.; MANTELL SH; applications of biotechnology for the conservation and sustainable exploitation of plants from brazilian rainforest E(ED) Plant conservation Biotechnology Dundee: University of Abertay 1999.

VILLA, Fabíola & Pasqual, Moacir & Pio, Leila & Fráguas, Chrystiane & Rezende, Juliana. (2009). UTILIZAÇÃO DE NITRATO DE AMÔNIO E DE URÉIA COMO FONTES DE NITROGÊNIO NA MICROPROPAGAÇÃO DE AMOREIRA-PRETA. *Scientia Agraria*. 10.

WADA, S.; NIEDZ, R.P.; REED, B.M. Determining nitrate and ammonium requirements for optimal in vitro response of diverse pear species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, v.51, n.1, p.19-27, 2015.

WHITE, P. R. **The Cultivation of Animal and Plant Cells**. New York: Ronald Press, 1962.

WORLD FLORICULTURE MAP. Food & Agribusiness. Raboobank. 2020.

XING, W. et al. Micropropagation of *Rosa rugosa* Through Axillary Shoot Proliferation. **Acta Biologica**. Series Botanica. v.52, 2010.

YUE, C. et al. "Investigating consumer preference for organic, local, or sustainable plants", **HortScience**, v. 46 n. 4, p. 610-615, 2011.

ZAHRA, Shabani & Ganji moghadam, Ebrahim & Bahram, Abedi & Tehranifar, Ali. (2015). The effect of plant growth regulators and their concentration in vitro on mass propagation of Myrobalan 29C rootstock. *Journal of Horticulture and Forestry*. 7. 57-64. 10.5897/JHF2014.0364.

ZAMSKI E., OSHRI S., ZIESLIN N. Comparative morphology and anatomy of axillary buds along a rose shoot. **Botanical Gazette** v.146: p.208–212. 1985.

ZANÃO, M. P. C. et al. Stake and substrate removal region in the vegetative propagation of rose bush. **Ornamental Horticulture**, v. 22, n. 1, p. 58-62, 2016.

ZANDI, P. The genus *Rosa*: The Aristocrat from the plant family with class, color and fragrance. *Irsen Newsletter*. 2015.

ZENG, F et al. Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and microarray. Plant Molecular Biology, v.60, p.167–183, 2006.

ZHOU Z.Q., et al. Dormancy and germination in *Rosa multibracteata*. **Scientia Horticulturae** v.119: p.434–441, 2009.

ZHOU, Z.Q. et al. Post-dispersal factors regulating dormancy and germination of *Rosa soulieana* seeds. **Belg. J. Bot.** p.103–111, 2008.

ZIEGLER K. **Favored Flowers: Culture and Economy in a Global System**, 2007.

ZIMMERMAN P.W., WILCOXON F. Several chemical growth substances which cause initiation of roots and other responses in plants. **Contributions from Boyce Thompson Institute** v.7, p.209–229, 1935.

ZLESKAK, D. C, THILL, C. A. e ANDERSON, N. O., Trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa chinensis minima* (Sims) Voss seedlings. **Euphytica**. V.141: p.281–290, 2005.